













# Proteínas de fase aguda em coelhos submetidos à colecistectomia laparoscópica – LigaSure versus eletrocirúrgico

## Acute-phase proteins in rabbits undergoing laparoscopic cholecystectomy: LigaSure device versus electro surgery

Ana Clara Silva Machado\*<sup>1</sup> , Mônica Carolina Nery Wittmaack<sup>1</sup> , Maria Camila Maldonado Vera<sup>1</sup> , Daniela Gomes da Silva<sup>1</sup> , Guilherme Sembenelli<sup>1</sup> , Gabriel Luiz Montanhim<sup>1</sup> , Cléber Kazuo Ido<sup>1</sup> , Juliana de Oliveira Ribeiro<sup>1</sup> , Mareliza Possa de Menezes<sup>1</sup> , Paola Castro Moraes<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), Jaboticabal, São Paulo, Brasil

\*autor correspondente: acmachado237@hotmail.com

**Resumo:** Estudos demonstram que o dispositivo selante de vasos DSV-LigaSure promove menor dano tecidual que o eletrocirúrgico bipolar e o aumento e diminuição das concentrações de proteínas e imunoglobulinas após a colecistectomia laparoscópica é esperado e transitório. Objetivou-se comparar os valores séricos das proteínas de fase aguda e imunoglobulinas de coelhos submetidos à dissecação da vesícula biliar utilizando eletrocirúrgico bipolar (pinça Maryland) e DSV-LigaSure para determinar qual dos dissectores apresentou menor alteração inflamatória. Vinte coelhos foram distribuídos em dois grupos com dez animais cada, sendo o Grupo 1 submetido à técnica de colecistectomia laparoscópica utilizando o eletrocirúrgico bipolar para dissecação e DSV-LigaSure para selar o ducto cístico e o Grupo 2, submetido à dissecação da vesícula biliar e selagem do ducto cístico utilizando o DSV-LigaSure. As proteínas de fase aguda e imunoglobulinas foram avaliadas nos dias três, sete e 15 do período pós-operatório. As concentrações séricas de fibrinogênio, transferrina, IgG,  $\alpha$ 1- glicoproteína ácida, PM 23000 Da e proteína C reativa não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, apenas diferenças significativas entre os dias de avaliação no mesmo grupo. IgA, ceruloplasmina e haptoglobina não apresentaram diferenças estatísticas entre grupos e nem entre dias de avaliação. Apenas albumina apresentou diferença entre grupos, onde o Grupo 1 demonstrou menor concentração da proteína após 15 dias. Ambos dissectores apresentaram alterações nas proteínas de fase aguda, demonstrando que não houve superioridade na técnica utilizando o DSV-LigaSure.

**Palavras-chave:** dissecação; inflamação; videocirurgia; vesícula biliar

**Abstract:** Studies have demonstrated that the LigaSure device causes less tissue damage than bipolar electro surgery. Increases and decreases in protein and immunoglobulin concentrations after laparoscopic cholecystectomy are expected and transient. This study aimed to compare serum values of acute-phase proteins and immunoglobulins in rabbits undergoing gallbladder dissection using bipolar electro surgery (Maryland forceps) and vessel sealing device (VSD) LigaSure. The objective was to determine which method resulted in less inflammatory change. Twenty rabbits were divided into two groups of ten each. Group 1 underwent laparoscopic cholecystectomy with bipolar electro surgical

Recebido: 21 de maio, 2024. Aceito: 25 de junho, 2024. Publicado: 24 de setembro, 2024.

forceps for dissection and LigaSure for sealing the cystic duct. Group 2 underwent dissection and cystic duct sealing using VSD–LigaSure only. Acute-phase proteins and immunoglobulins were evaluated on postoperative days three, seven, and fifteen. Serum concentrations of fibrinogen, transferrin, IgG,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, PM 23000 Da, and C-reactive protein (CRP) did not differ significantly between groups. However, significant differences were observed between evaluation days within the same group. IgA, ceruloplasmin, and haptoglobin were not statistically analyzed for either group or day comparisons. Only albumin levels differed between groups, with group 1 showing a lower protein concentration on day 15. Both methods caused changes in acute-phase proteins, indicating no significant advantage for using the LigaSure device.

**Keywords:** dissection; gallbladder; inflammation; video surgery

## 1. Introdução

A utilização de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas tem se intensificado na Medicina Veterinária nos últimos anos e estão ligadas ao menor dano tecidual, tempo de recuperação, dor, e demonstram menos complicações pós-cirúrgicas em relação a técnica aberta <sup>(1)</sup>. O trauma cirúrgico estimula o processo inflamatório a partir da liberação de citocinas, porém a redução do trauma cirúrgico por meio de técnicas menos invasivas como a laparoscopia, parecem induzir menor resposta inflamatória <sup>(2)</sup>.

A colecistectomia laparoscópica (CL) é indicada nos casos de alterações da vesícula biliar, como colecistites, mucocele, neoplasias e rupturas. Estudo em humanos, comparam diversas técnicas e suas abordagens, e quais são mais viáveis de acordo com o grau de inflamação <sup>(2)</sup>.

Há vários estudos envolvendo cirurgias laparoscópicas que apontam a utilização do dispositivo selante de vasos (DSV - LigaSure) e dispositivos harmônicos que utilizam energia bipolar ou ultrassônica, com objetivo de selar e/ou cortar. A alta frequência promove o aquecimento e desnaturação da proteína dentro do tecido, criando um colágeno desnaturado e molde de elastina, gerando assim, selo biológico <sup>(3,4)</sup>. Outro estudo, avaliou diferentes dispositivos empregados na cirurgia laparoscópica em suínos e sua capacidade de causar formação de aderências pós-operatórias. No estudo citado, há comparação entre eletrocautério monopolar e DSV LigaSure. O grupo onde se utilizou o DSV-LigaSure não apresentou aderências, entretanto o grupo do eletrocautério monopolar apresentou maior escore de aderências <sup>(5)</sup>. Em outro estudo, concluiu-se que o DSV-LigaSure apresentou boa performance para realizar o procedimento de esplenectomia em cães, pois permitiu boa hemostasia, sem necessidade de dissecação cirúrgica antes da selagem dos vasos e mínimas complicações pós-operatórias <sup>(6)</sup>.

As proteínas de fase aguda (PFAs) são caracterizadas como proteínas sanguíneas que apresentam alterações em suas concentrações a partir de injúrias cirúrgicas, infecção, inflamações e estresse. As alterações de concentrações das PFAs estão ligadas à gravidade do distúrbio e extensão do dano tecidual, auxiliando no diagnóstico e prognóstico dos indivíduos. Após a injúria, é ativada a resposta inflamatória, denominada resposta de fase aguda, liberando citocinas como as interleucinas que são capazes de estimular a liberação de leucócitos, fibroblastos, células endoteliais e a sintetização das proteínas de fase aguda nos hepatócitos. Podem ser classificadas de acordo com suas concentrações positivas ou negativas.

Ao mesmo tempo em que o organismo aumenta a produção de algumas proteínas ocorre também a queda de outras, através da inibição de sua síntese. As concentrações séricas das proteínas positivas aumentam durante o processo de injúria e inflamação, já as negativas, diminuem a concentração. A proteína C-reativa, haptoglobina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina e fibrinogênio, estão entre as positivas, enquanto albumina e transferrina, são consideradas negativas<sup>(7,8,9)</sup>.

Neste estudo, coelhos foram submetidos a dissecação da vesícula biliar através da CL, utilizando DSV- LigaSure ou pinça Maryland (eletrocirúrgico bipolar) com o objetivo de comparar qual técnica promove menor alteração inflamatória através do comportamento das proteínas de fase aguda e imunoglobulinas.

## 2. Material e métodos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp – *Câmpus* de Jaboticabal (protocolo nº016539/17). Foram utilizados 20 coelhos da raça Nova Zelândia Branco, com peso entre 3,0 e 4,0 kg, machos e com oito a 12 meses de idade. Os 20 coelhos foram distribuídos em Grupo 1 (Eletrocirúrgico bipolar – Maryland) e Grupo 2 (Dispositivo selante de vasos – DSV – LigaSure), com 10 animais cada. Previamente ao procedimento cirúrgico, todos os coelhos passaram por avaliação física e hematológica (hemograma, proteína total, albumina, GGT, FA, ALT, AST, bilirrubina total e direta). O exame ultrassonográfico do abdômen foi realizado em todos os animais para verificar as vias biliares e certificar a ausência de possíveis distúrbios.

### 2.1 Protocolo anestésico

Os coelhos não foram submetidos a jejum alimentar e hídrico por ser rara a ocorrência de êmese durante os procedimentos anestésicos-cirúrgicos. Como medicação pré-anestésica foi administrado morfina (1 mg/kg) e acepromazina (0,05 mg/kg) por via intramuscular. Após 20 minutos, foi realizada indução com máscara anestésica utilizando isoflurano, em seguida, foi instilada lidocaína spray a 10% na cavidade oral e posteriormente, realizada a intubação orotraqueal e foram mantidos em ventilação espontânea. A intubação foi confirmada através do capnógrafo.

### 2.2 Técnica Cirúrgica e pós-operatório

Após a indução anestésica, os coelhos foram colocados em decúbito dorsal e realizou-se a tricotomia da porção ventral e lateral do abdômen. Os animais foram colocados em posição de Trendelenburg reverso com o lado direito para cima permitindo que o estômago e o intestino delgado se movessem caudalmente. A antisepsia prévia e definitiva foi realizada com clorexidina 2% e álcool 70%, seguida de colocação de campos cirúrgicos. Uma incisão cutânea de 0,5 cm foi feita na linha média abdominal ventral, um centímetro caudal à cicatriz umbilical. Após dissecação subcutânea, foi feita pequena incisão de 3-4 mm na linha alba, penetrando na cavidade abdominal. Em seguida, foi introduzido um trocarte de 5 mm, no qual

foi colocado o laparoscópio de 5 mm, acoplado à microcâmera e à fonte de luz. O insuflador foi acoplado à cânula, inflando a cavidade peritoneal com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a uma velocidade de 2,0 L/min. Dois portais de acesso de 5 mm foram inseridos no quadrante cranial do abdome direito, localizados 3 e 5 cm lateral à linha média e 3 e 4 cm cranial à cicatriz umbilical, posicionados para obter-se triangulação em torno da localização da vesícula biliar. Por esses dois portais, foram inseridas pinça de apreensão atraumática Babcock para elevação do lobo hepático e manipulação da vesícula biliar. Um quarto portal de 5 mm foi inserido no quadrante abdominal esquerdo (próximo ao arco costal), e foi usado para introduzir o eletrocirúrgico bipolar (pinça Maryland) ou LigaSure (DSV – LigaSure) (Figura 1).

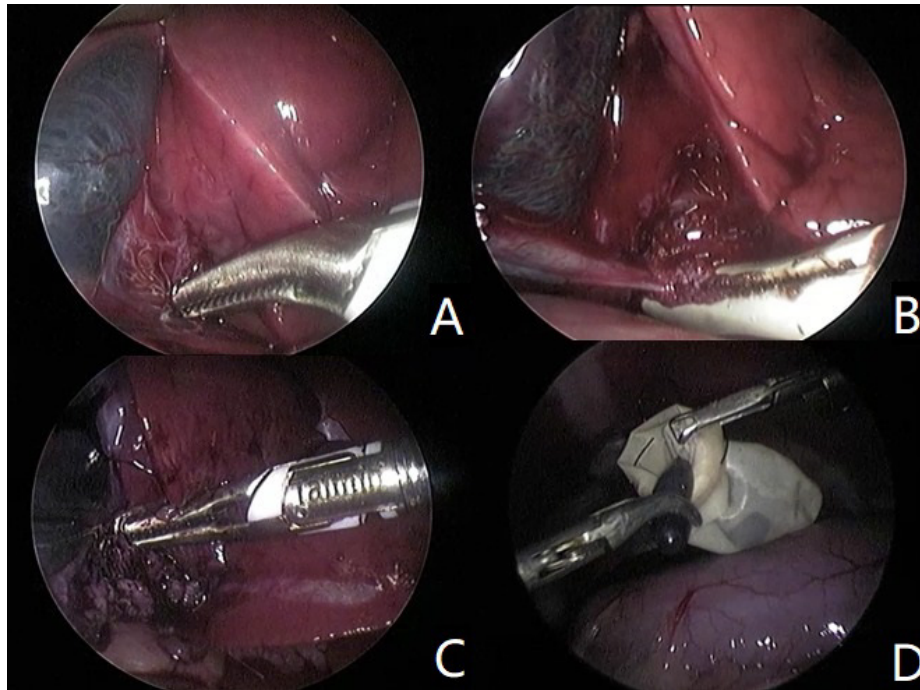


**Figura 1** Técnica cirúrgica de colecistectomia em coelhos. (A) Local de acesso de primeiro, segundo, terceiro e quarto portal. (B) Local de inserção dos quatro portais de acesso e LigaSure. (C) Retirada de vesícula biliar dentro da bolsa de recuperação.

Após a identificação da vesícula biliar e do ducto cístico, a vesícula biliar foi apreendida com pinça atraumática, realizando apreensão e retração do fundo vesicular no sentido cranial e lateral direito sobre a cúpula hepática. O infundíbulo foi identificado e apreendido e em seguida retraído lateralmente em direção ao quadrante inferior direito com outra pinça atraumática, expondo o triângulo de Calot, que foi dissecado para expor o ducto cístico, a artéria cística e o linfonodo. Após identificação dessas estruturas, a artéria cística foi selada com LigaSure (DSV – LigaSure) em ambos os grupos.

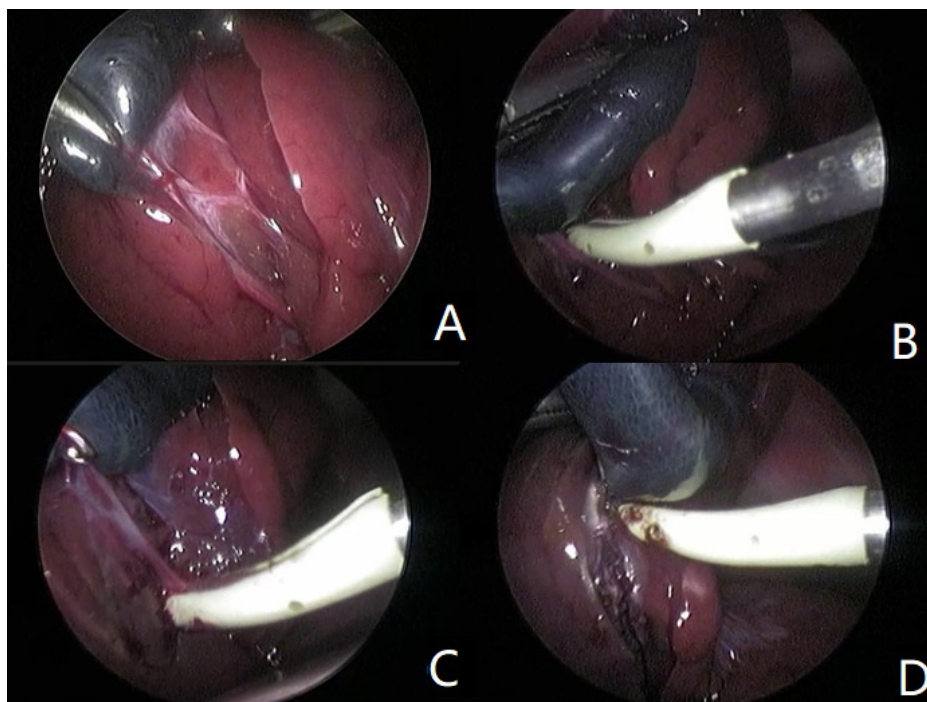
Nos animais do Grupo 1 (n=10), a dissecação da vesícula biliar iniciou-se pelo triângulo de Calot com eletrocirúrgico bipolar (pinça Maryland) até que determinasse que a única estrutura remanescente conectada à vesícula biliar era o ducto cístico. Sua selagem foi realizada com o LigaSure (DSV – LigaSure™) onde duas oclusões ao redor do ducto foram realizadas. Após a oclusão e transecção do ducto cístico, as inserções peritoneais entre a vesícula biliar e seu leito hepático foram dissecadas com eletrocirúrgico bipolar (pinça Maryland) (Figura 2).





**Figura 2** Grupo 1 – eletrocirúrgico bipolar (pinça Maryland) (A) Dissecção do triângulo de Calot com pinça bipolar Maryland. (B) Oclusão do ducto cístico realizado com LigaSure (DSV – LigaSure). (C) Dissecção nas inserções peritoneais entre vesícula biliar e leito hepático pela pinça bipolar Maryland. (D) Vesícula biliar colocada na bolsa de recuperação para sua retirada.

Já nos animais do Grupo 2 (n=10) foi realizada a dissecção da vesícula biliar através do triângulo de Calot, oclusão e transecção do ducto cístico com o DSV- LigaSure™ (Figura 3).



**Figura 3** Grupo 2 – LigaSure (DSV – LigaSure) (A) Exposição do triângulo de Calot, ducto cístico e artéria cística. (B) Dissecção do triângulo de Calot com LigaSure (DSV – LigaSure). (C) Oclusão e transecção do ducto cístico. (D) Dissecção nas inserções peritoneais entre vesícula biliar e leito hepático com LigaSure (DSV – LigaSure).

Após a dissecação completa da vesícula biliar e secção do ducto cístico, o órgão foi colocado dentro da bolsa de recuperação. A bolsa foi removida ampliando a incisão do portal direito. Antes da remoção endoscópica, a fossa hepática foi avaliada para verificar a ausência de hemorragia e vazamento de bile. Realizou-se a remoção do gás da cavidade abdominal e a cânula e o endoscópio foram removidos. A miorrafia foi realizada com fio Poliglecaprone 2-0 e padrão de sutura Sultan e a dermorrafia com fio nylon 2-0 e padrão de sutura simples separado.

No pós-operatório imediato foram administrados cloridrato de tramadol (4 mg/kg), meloxicam (0,1 mg/kg) e enrofloxacina (5 mg/kg) por via subcutânea. No pós operatório, foi administrado por via subcutânea, cloridrato de tramadol (4 mg/kg) a cada oito horas por três dias, meloxicam (0,1 mg/kg) a cada 24 horas por dois dias e enrofloxacina (5 mg/kg) a cada 12 horas por sete dias.

### 2.3 Colheita das amostras de sangue venoso

As amostras de sangue venoso foram obtidas por meio de venopunção jugular nos momentos zero (D0) período pré-operatório, três (D3), sete (D7) e 15 (D15) dias após a cirurgia. Foram colhidas amostras de 2 mL de sangue em frascos contendo citrato de sódio (Trombostab® ref.45 – Labtest®), para a determinação da concentração plasmática de fibrinogênio, e amostras de 2 mL de sangue em frascos sem anticoagulante, para a realização de proteinograma sérico e determinação das concentrações séricas de proteínas totais e proteína C-reativa. O plasma foi separado e congelado a -20°C após a centrifugação das amostras a 1.500 x g durante 15 minutos. Após a retração do coágulo, os tubos sem anticoagulante também foram centrifugados a 1.500 x g durante 15 minutos, para obtenção do soro sanguíneo e as amostras congeladas a -20°C.

As concentrações plasmáticas de fibrinogênio foram determinadas em coagulômetro (Clot Quick Timer II, Drake®) com a utilização de kit comercial (Fibrinogênio, Ref. 506-4/2 – Labtest Diagnóstica S.A.), no máximo, 15 dias após o congelamento das amostras.

### 2.4 Concentração sérica de proteínas

O fracionamento proteico foi realizado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo técnica proposta por Laemmli (1970). Após o fracionamento, o gel foi corado durante duas horas em solução de azul de coomassie 0,2% e, posteriormente, descorado em solução de metanol e ácido acético para retirar o excesso de corante, até que as frações proteicas se apresentassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado (Shimadzu CS-9301 PC, Shimadzu). Como referência, foi utilizada uma solução marcadora (SigmaMaker™, S8445- wide range, mol wt 6,500- 200,000 Da, Sigma) com diferentes pesos moleculares (200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20 kDa). As proteínas avaliadas foram IgA, ceruloplasmina, transferrina, albumina, IgG, haptoglobina,  $\alpha$ 1 - glicoproteína ácida e PM 23000 Da.

A determinação da concentração sérica da proteína C-reativa foi determinada pelo método de imunoturbidimetria em espectrofotômetro semi-automático (Labquest, Labtest

Diagnóstica S.A) utilizando-se kit comercial (PCR Turbiquest Max, Ref 3002, Labtest Diagnóstica S.A). A determinação da concentração sérica das proteínas totais foi determinada pelo método do biureto em espectrofotômetro automático (Labquest, Labtest Diagnóstica S.A) utilizando-se kit comercial (Proteínas Totais, Ref 99-1/250, Labtest Diagnóstica S.A).

### 2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando os softwares R (versão 4.4.1) e GraphPad Prism (versão 6.01). Os efeitos de ambos os grupos (Grupo 1 x Grupo 2) e os dias de avaliação (D0, D3, D7 e D15) em relação às variáveis foram avaliados pelo teste de Friedman. A possível interação entre grupos e dias de avaliação foi avaliada usando o teste de Kruskal-Wallis e Dunn. Os resultados de cada variável são apresentados como mediana  $\pm$  intervalo interquartil (IQR). Em todos os testes, a significância foi declarada em  $p \leq 0,05$ .

## 3. Resultados

Os resultados das concentrações de proteínas e imunoglobulinas em coelhos submetidos à colecistectomia laparoscópica utilizando eletrocirúrgico bipolar (Grupo 1) e dispositivo selante de vasos (Grupo 2) são apresentados na Tabela 1 e na Figura 4.

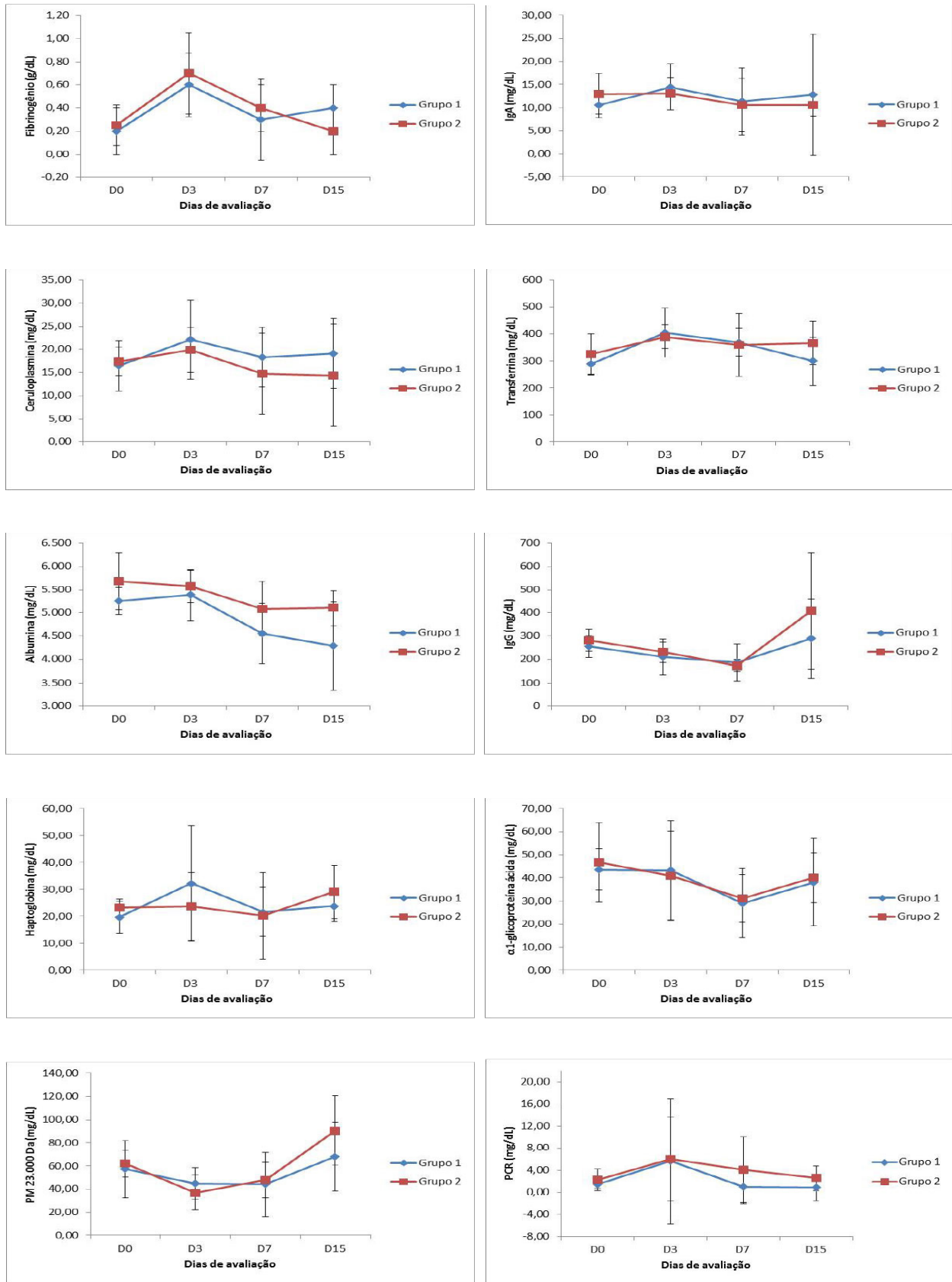
**Tabela 1** Mediana  $\pm$  intervalo interquartil das concentrações de proteínas de fase aguda e imunoglobulinas em coelhos submetidos à colecistectomia laparoscópica utilizando eletrocirúrgico bipolar (Grupo 1) e dispositivo selante de vasos (Grupo 2).

Proteínas	Dias de Avaliação			
	D0	D3	D7	D15
<b>Fibrinogênio(g/dL)</b>				
Grupo 1	0,20 $\pm$ 0,20 <sup>Aa</sup>	0,60 $\pm$ 0,28 <sup>Ab</sup>	0,30 $\pm$ 0,35 <sup>Aab</sup>	0,40 $\pm$ 0,20 <sup>Aab</sup>
Grupo 2	0,25 $\pm$ 0,18 <sup>Aa</sup>	0,70 $\pm$ 0,35 <sup>Ab</sup>	0,40 $\pm$ 0,20 <sup>Aab</sup>	0,20 $\pm$ 0,20 <sup>Aa</sup>
<b>IgA (mg/dL)</b>				
Grupo 1	10,5 $\pm$ 2,79 <sup>Aa</sup>	14,4 $\pm$ 4,97 <sup>Aa</sup>	11,4 $\pm$ 7,25 <sup>Aa</sup>	12,8 $\pm$ 13,1 <sup>Aa</sup>
Grupo 2	12,9 $\pm$ 4,44 <sup>Aa</sup>	13,0 $\pm$ 3,48 <sup>Aa</sup>	10,6 $\pm$ 5,71 <sup>Aa</sup>	10,5 $\pm$ 2,29 <sup>Aa</sup>
<b>Ceruloplasmina(mg/dL)</b>				
Grupo 1	16,5 $\pm$ 5,40 <sup>Aa</sup>	22,1 $\pm$ 8,55 <sup>Aa</sup>	18,4 $\pm$ 6,50 <sup>Aa</sup>	19,1 $\pm$ 7,57 <sup>Aa</sup>
Grupo 2	17,4 $\pm$ 3,05 <sup>Aa</sup>	19,9 $\pm$ 4,82 <sup>Aa</sup>	14,7 $\pm$ 8,71 <sup>Aa</sup>	14,4 $\pm$ 11,0 <sup>Aa</sup>
<b>Transferrina (mg/dL)</b>				
Grupo 1	290 $\pm$ 41,3 <sup>Aa</sup>	405 $\pm$ 90,5 <sup>Ab</sup>	370 $\pm$ 51,8 <sup>Aab</sup>	300 $\pm$ 89,3 <sup>Aa</sup>
Grupo 2	325 $\pm$ 74,9 <sup>Aa</sup>	390 $\pm$ 44,8 <sup>Ab</sup>	359 $\pm$ 115 <sup>Aab</sup>	367 $\pm$ 79,5 <sup>Aab</sup>
<b>Albumina (mg/dL)</b>				
Grupo 1	5.261 $\pm$ 290 <sup>Aab</sup>	5.383 $\pm$ 547 <sup>Aa</sup>	4.549 $\pm$ 649 <sup>Abc</sup>	4.295 $\pm$ 939 <sup>Ac</sup>
Grupo 2	5.684 $\pm$ 607 <sup>Aa</sup>	5.568 $\pm$ 354 <sup>Aab</sup>	5.089 $\pm$ 588 <sup>Ab</sup>	5.106 $\pm$ 376 <sup>Bb</sup>
<b>Haptoglobina (mg/dL)</b>				
Grupo 1	19,8 $\pm$ 5,96 <sup>Aa</sup>	32,2 $\pm$ 21,4 <sup>Aa</sup>	21,6 $\pm$ 9,00 <sup>Aa</sup>	23,8 $\pm$ 5,81 <sup>Aa</sup>
Grupo 2	23,2 $\pm$ 3,21 <sup>Aa</sup>	23,7 $\pm$ 12,4 <sup>Aa</sup>	20,2 $\pm$ 16,1 <sup>Aa</sup>	29,1 $\pm$ 9,87 <sup>Aa</sup>
<b>IgG (mg/dL)</b>				
Grupo 1	256 $\pm$ 48,3 <sup>Aab</sup>	211 $\pm$ 76,4 <sup>Aa</sup>	187 $\pm$ 79,2 <sup>Aa</sup>	289 $\pm$ 170 <sup>Ab</sup>

Grupo 2	281 ± 47,5 <sup>Aa</sup>	231 ± 43,3 <sup>Aab</sup>	174 ± 24,4 <sup>Ab</sup>	409 ± 249 <sup>Aa</sup>
<b>α-glicoproteína ácida (mg/dL)</b>				
Grupo 1	43,6 ± 8,85 <sup>Aa</sup>	43,2 ± 21,5 <sup>Aa</sup>	29,1 ± 14,9 <sup>Aa</sup>	38,0 ± 18,9 <sup>Aa</sup>
Grupo 2	46,7 ± 17,2 <sup>Aa</sup>	41,0 ± 19,3 <sup>Aab</sup>	31,0 ± 10,4 <sup>Ab</sup>	40,0 ± 10,8 <sup>Aab</sup>
<b>PM 23.000 Da (mg/dL)</b>				
Grupo 1	57,2 ± 24,6 <sup>Aa</sup>	44,8 ± 13,7 <sup>Ab</sup>	44,0 ± 27,7 <sup>Aab</sup>	67,9 ± 29,5 <sup>Aa</sup>
Grupo 2	62,0 ± 11,5 <sup>Aac</sup>	36,9 ± 15,2 <sup>Ab</sup>	48,0 ± 15,4 <sup>Aab</sup>	90,4 ± 29,7 <sup>Ac</sup>
<b>PCR (mg/dL)</b>				
Grupo 1	1,50 ± 0,70 <sup>Aab</sup>	5,65 ± 11,3 <sup>Aa</sup>	1,00 ± 3,00 <sup>Ab</sup>	0,90 ± 2,40 <sup>Ab</sup>
Grupo 2	2,28 ± 1,90 <sup>Aa</sup>	6,00 ± 7,60 <sup>Ab</sup>	4,10 ± 5,95 <sup>Aab</sup>	2,55 ± 2,21 <sup>Aa</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Dunn ( $p > 0,05$ ).





**Figura 4** Representação gráfica da mediana  $\pm$  intervalo interquartil das concentrações de proteínas de fase aguda e imunoglobulinas em coelhos submetidos à colecistectomia laparoscópica utilizando electrocirúrgico bipolar (Grupo 1) e dispositivo selante de vasos (Grupo 2).

As concentrações plasmáticas de fibrinogênio e as concentrações séricas de transferrina, IgG,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, PM 23.000 Da e proteína C reativa (PCR) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ( $p>0,05$ ), porém apresentaram diferenças ao longo do tempo no mesmo grupo ( $p<0,05$ ). Por outro lado, as concentrações séricas de IgA, ceruloplasmina e haptoglobina não apresentaram diferença estatística entre grupos e nem entre dias de avaliação no mesmo grupo ( $p>0,05$ ). Apenas a concentração sérica de albumina apresentou diferença entre grupos e entre os dias de avaliação no mesmo grupo ( $p<0,05$ ).

Em relação às concentrações plasmáticas de fibrinogênio, foi observada diferença entre o valor basal (D0) e D3 no Grupo 1 ( $p<0,05$ ), onde verificou-se maior concentração no D3 (0,60 g/dL) e, no Grupo 2, entre D0 e D3 e D3 e D15, sendo constatadas maiores concentrações plasmáticas de fibrinogênio também no D3 (0,70 g/dL).

Notou-se diferença das concentrações séricas de transferrina no Grupo 1 entre os dias D0 e D3 ( $p<0,05$ ), com maiores concentrações no D3 (405 mg/dL), e entre D3 e D15 ( $p<0,05$ ), sendo observado no D15 o menor valor entre os dias de avaliação após o procedimento cirúrgico (300 mg/dL). O Grupo 2 apresentou diferença apenas entre D0 (325 mg/dL) e D3 (390 mg/dL) ( $p<0,05$ ).

Verificou-se diferença significativa das concentrações séricas de albumina entre os dois grupos experimentais no D15 ( $p<0,05$ ), quando as concentrações da proteína foram menores no Grupo 1 se comparado com o Grupo 2 (4.295 g/dL e 5.106 g/dL, respectivamente). Além disso, foi constatada diferença entre os dias D0 e D15, D3 e D7 e D3 e D15 no Grupo 1 ( $p<0,05$ ), com menores concentrações no D7 (4.295 mg/dL). No Grupo 2, notou-se diferença significativa entre D0 e D7 e D0 e D15 ( $p<0,05$ ), com menores concentrações no D7 (5.089 mg/dL). O Grupo 2 apresentou maiores concentrações séricas de albumina em todos os dias avaliados quando comparado ao Grupo 1.

Apesar de não terem sido observadas diferenças entre as concentrações séricas de IgG entre os grupos ( $p>0,05$ ), no Grupo 1 foram constatadas diferenças significativas entre D3 e D15 e D7 e D15 ( $p>0,05$ ), com maiores valores no D15 (289 mg/dL) enquanto que no Grupo 2 notou-se diferenças significativas entre D0 e D7 e D7 e D15 ( $p<0,05$ ), com maiores valores também no D15 (409 mg/dL).

Não foram observadas diferenças entre as concentrações séricas da  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida no Grupo 1 entre os dias de avaliação ( $p>0,05$ ). Já no Grupo 2, foram verificadas diferenças entre D0 (46,7 mg/dL) e D7 (31,0 mg/dL) ( $p<0,05$ ). Ambos os grupos apresentaram no D7 as menores concentrações da proteína nos dias avaliados (29,1 mg/dL e 31,0 mg/dL, respectivamente).

Foram constatadas diferenças da concentração sérica da proteína PM 23.000 Da no Grupo 1 entre os dias D0 e D3 e D3 e D15 ( $p<0,05$ ) e no Grupo 2 entre os dias D0 e D3, D3 e D15 e D7 e D15 ( $p<0,05$ ). Em ambos os grupos as maiores concentrações da proteína foram notadas no D15 (67,9 e 90,4 mg/dL, respectivamente).

Apesar de não terem sido observadas diferenças entre as concentrações séricas de PCR entre os Grupos 1 e 2 ( $p > 0,05$ ), foram verificadas diferenças no Grupo 1 entre D3 e D7 e D3 e D15 ( $p > 0,05$ ), com maiores valores no D3 (5,65 mg/dL) enquanto que no Grupo 2 constatou-se diferenças significativas entre D0 e D3 e D3 e D15 ( $p < 0,05$ ), com maiores valores também no D3 (6,00 mg/dL).

Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstram que a maioria das correlações significativas entre as variáveis das proteínas e imunoglobulinas foram fracas, algumas moderadas (Transferrina e Haptoglobina, Haptoglobina e  $\alpha$ 1-glicoproteína Ácida, PM 23.000 Da e Fibrinogênio, PM 23.000 Da e PCR, PCR e Fibrinogênio) e não demonstrou nenhuma correlação forte. Já em relação ao valor de  $p$  ( $< 0,05$ ) a PCR obteve correlação positiva com Fibrinogênio, Ceruloplasmina, Transferrina,  $\alpha$ 1 Glicoproteína Ácida e PM 23.000 Da.

**Tabela 2** Coeficiente de correlação de Spearman e valor de  $p$  entre as concentrações das proteínas de fase aguda e imunoglobulinas em coelhos submetidos a colecistectomia laparoscópica utilizando dispositivo selante de vaso e eletrocirúrgico bipolar para dissecação de vesícula biliar.

Parâmetros	IgA	Cerul	Transf	Alb	IgG	Hapto	$\alpha$ 1-glico	PM 23.000	PCR
<b>Fib</b>	rho = 0,13 p = 0,2337	rho = 0,11 p = 0,3369	rho = 0,25 p = 0,0269	rho = 0,13 p = 0,2694	rho = -0,24 p = 0,0295	rho = -0,07 p = 0,5513	rho = -0,07 p = 0,5087	rho = -0,41 p = 0,0002	rho = 0,40 p = 0,0010
<b>IgA</b>		rho = 0,25 p = 0,0267	rho = 0,25 p = 0,0280	rho = 0,20 p = 0,0756	rho = -0,04 p = 0,7035	rho = 0,09 p = 0,4436	rho = 0,16 p = 0,1628	rho = -0,11 p = 0,3103	rho = 0,03 p = 0,7949
<b>Cerul</b>			rho = -0,03 p = 0,8110	rho = 0,004 p = 0,9701	rho = 0,17 p = 0,1375	rho = 0,16 p = 0,1479	rho = 0,26 p = 0,0177	rho = -0,26 p = 0,0182	rho = 0,31 p = 0,0127
<b>Transf</b>				rho = 0,33 p = 0,0030	rho = -0,15 p = 0,1744	rho = 0,41 p = 0,0002	rho = 0,22 p = 0,0508	rho = -0,17 p = 0,1304	rho = 0,30 p = 0,0145
<b>Alb</b>					rho = -0,06 p = 0,5812	rho = 0,29 p = 0,0102	rho = 0,39 p = 0,0005	rho = -0,10 p = 0,3894	rho = 0,09 p = 0,4761
<b>IgG</b>						rho = 0,11 p = 0,3177	rho = 0,35 p = 0,0016	rho = 0,39 p = 0,0003	rho = -0,10 p = 0,4353
<b>Hapto</b>							rho = 0,45 p < 0,0001	rho = 0,04 p = 0,7341	rho = 0,22 p = 0,0790
<b><math>\alpha</math>1-glico</b>								rho = 0,10 p = 0,3671	rho = 0,35 p = 0,0042
<b>PM 23.000</b>									rho = -0,41 p = 0,0008
<b>PCR</b>									

Considerou-se o escore fraco ( $0,01 \leq r \leq 0,39$ ), moderado ( $0,40 \leq r \leq 0,69$ ) e forte ( $0,70 \leq r \leq 1,00$ ) para a classificação do nível de correlação entre as variáveis. Fib – Fibrinogênio, Cerul – Ceruloplasmina, Transf – Transferrina, Alb – Albumina, Hapto – Haptoglobina,  $\alpha$ 1-glico –  $\alpha$ 1- glicoproteína ácida, PCR – proteína C-reativa.

#### 4. Discussão

Apesar da evolução de técnicas cirúrgicas menos invasivas, a técnica cirúrgica de colecistectomia por laparoscopia não está bem difundida na rotina da Medicina Veterinária. Em



relação às técnicas convencionais, com abertura da cavidade, as técnicas laparoscópicas demonstram índices de recuperação mais rápida no pós-operatório, precisão diagnóstica, taxa de infecção reduzida, entre outras vantagens. Entretanto, sabe-se que o trauma cirúrgico provoca alterações metabólicas, imunológicas e neuroendócrinas, criando reação inflamatória e anti-inflamatória para corrigir os danos causados pelo trauma. Assim, são liberadas citocinas na corrente sanguínea que contribuem para possíveis síndromes de respostas inflamatórias, falha de órgãos e sepse <sup>(1,10)</sup>.

No estudo em que avaliou a hemostasia e dano térmico em vasos mesentéricos de cabras utilizando eletrocirúrgico bipolar, LigaSure e bisturi ultrassônico, o eletrocirúrgico bipolar demonstrou maior dano térmico do que o LigaSure, que também obteve resultado mais satisfatório em relação a hemostasia dos vasos <sup>(11)</sup>. Na ovariectomia em coelhas utilizando o LigaSure, o tempo cirúrgico foi menor comparado com a utilização das ligaduras convencionais <sup>(12)</sup>. Para selagem de artéria e veia renal em suínos, onde comparou-se o LigaSure e o eletrocirúrgico bipolar, o LigaSure obteve resultado satisfatório em todos os animais e o eletrocirúrgico demonstrou falha em dois deles, ademais o eletrocirúrgico bipolar causou danos térmicos nos tecidos dificultando o processo de oclusão <sup>(13)</sup>. No presente estudo, ambos disectores utilizados ocasionaram aumento nos níveis basais das PFAs no mesmo grupo em dias diferentes, como no caso da proteína c reativa, porém entre os grupos apenas a albumina apresentou diferença entre grupos no D15.

Em humanos, comparou-se o impacto no parênquima hepático durante sua transecção utilizando energia ultrassônica e dispositivo selante de vasos, os valores de PCR não tiveram significância entre os grupos, concluindo-se que ambas as energias podem ser utilizadas <sup>(14)</sup>. Outro estudo em humanos, comparou a utilização do dispositivo selante de vasos e eletrocirúrgico monopolar no procedimento de lobectomia e linfadenectomia pulmonar por toracoscopia e demonstrou que não houve diferença nos valores de PCR entre ambos <sup>(15)</sup>. Atualmente estuda-se que maiores alterações nas concentrações de PFAs podem ser atribuídas ao uso de eletrocautérios <sup>(16)</sup>. Um estudo aponta que a meia vida plasmática da PCR em coelhos é de quatro a seis horas, outro estudo demonstra que o pico de concentração sérica da proteína foi atingido em três dias após a injúria <sup>(17,18)</sup>. No entanto, ambos os grupos do presente trabalho tiveram os níveis de PCR aumentados no terceiro dia pós-operatório, e no sétimo dia de avaliação pós-operatória o grupo 2 demonstrou aumento nos níveis de PCR, entretanto não houve diferença entre os grupos. Em ambos os grupos, os valores de PCR voltaram à normalidade em 15 dias de pós-operatório. Estudos em humanos também demonstram o aumento de PCR e outros fatores inflamatórios, mesmo em técnicas de colecistectomia minimamente invasivas <sup>(16)</sup>.

A IgG é produzida em resposta a agentes infecciosos e toxinas, o aumento está ligado às doenças infecciosas, doenças hepáticas, doenças dos tecidos conjuntivos, entre outros <sup>(19)</sup>. O trauma cirúrgico pode induzir a queda do sistema imunológico e, segundo estudo que comparou a função imunológica pós colecistectomia laparoscópica em humanos, dosando imunoglobulinas como IgG e IgA, houve mudanças mínimas nas funções imunológicas, sendo que os

valores voltaram aos níveis basais seis dias após o procedimento <sup>(20)</sup>. Outro estudo demonstrou que no primeiro dia pós-operatório a IgG diminuíram e retornaram aos níveis basais no terceiro dia <sup>(21)</sup>. No estudo em questão, os valores de IgA e IgG não apresentaram diferença entre os grupos. Entretanto, a concentração sérica de IgG apresentou diferença entre os dias avaliados no mesmo grupo, onde o D15 de ambos os grupos demonstrou maiores valores.

A Haptoglobina não apresentou alterações em seus valores entre os grupos e nem entre os dias de avaliação. Já o fibrinogênio apresentou diferença entre os dias avaliados, onde demonstrou no dia três em ambos os grupos a maior concentração. Foi relatado aumento da concentração plasmática de fibrinogênio no pós-operatório de colecistectomia por laparoscópica ou utilizando a técnica aberta em humanos <sup>(22)</sup>. Num outro estudo que utilizou a técnica de ovariectomia por laparoscopia em cadelas também foi observado aumento das concentrações da haptoglobina. Seu aumento foi encontrado 72 horas após o procedimento cirúrgico, sendo comum em situações de hemorragia ou hemólise <sup>(23)</sup>. Estas alterações não foram observadas no presente estudo.

Estudos em humanos apontaram a importância da concentração sérica de albumina pré e pós-operatória nos casos de colecistectomia laparoscópica, afirmando que a dosagem da proteína pode influenciar na mortalidade e morbidade pós-cirúrgica <sup>(24)</sup>. Foi reportado aumento na concentração de albumina no pós-cirúrgico de colecistectomia laparoscópica em cães nas primeiras 48 horas <sup>(25)</sup>. Em outro estudo, cães submetidos à colecistectomia laparoscópica e que vieram a óbito no pós-operatório demonstraram menor concentração de albumina nas dosagens pós-operatórias <sup>(26)</sup>. Em coelhos, a meia vida da albumina é de cinco dias. Sabe-se que o meio tempo de liberação da albumina pode ser de dois dias em camundongos a 19 dias em cavalos. Visto que a albumina e a transferrina são proteínas de fase aguda negativas, tendem a ter diminuição de dosagem após injúrias <sup>(27,28)</sup>. Ainda assim, a albumina pode ser considerada uma proteína de lesão crônica, limitando a literatura sobre a proteína e a relação aos danos cirúrgicos <sup>(23)</sup>. Foi observado menor concentração significativa da albumina do grupo 1 em relação ao grupo 2, 15 dias após o procedimento cirúrgico.

## 5. Conclusão

Conclui-se que há pouca diferença entre a utilização dos dissectores eletrocirúrgico bipolar (pinça Maryland) e LigaSure (DSV – LigaSure™) considerando a avaliação das concentrações séricas de fibrinogênio, IgA, ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina, IgG,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, PM 23000 Da e PCR, nos dias três, sete e 15 após o procedimento, sugerindo que ambos dissectores são adequados para realizar a técnica de colecistectomia laparoscópica.

### Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.



## Contribuições do autor

*Conceituação:* M.C.N Wittmaack, C.K Ido, J.O Ribeiro, M.P de Menezes, P.C Moraes; *Análise formal:* D.G da Silva; *Aquisição de financiamento:* M.C.N Wittmaack e P.C Moraes; *Investigação:* A.C.S Machado, M.C.N Wittmaack, C.K Ido, J.O Ribeiro, M.P de Menezes, P.C Moraes; *Metodologia:* A.C.S Machado, M.C.M Vera, G Sembenelli, G. L. Montanhim, C.K Ido, J.O Ribeiro, M.P de Menezes; *Recursos:* D.G da Silva; *Supervisão:* P.C Moraes; *Visualização:* A.C.S Machado; *Redação (esboço original):* A.C.S Machado; *Redação (revisão e edição):* M.C.N Wittmaack e P.C Moraes.

## Disponibilidade de dados

Os dados estarão disponíveis se solicitados.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à (FAPESP) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo 2017/23402-8), CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (processo 88887.529086/2020-00).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico - CNPq pela bolsa e auxílio financeiro que possibilitaram a dedicação integral ao programa de pós-graduação e a operacionalização do estudo.

## Referências

1. Benevides MPA. Colecistectomia por Laparoscopia em cães. PubVet. 2021 Jul; 15:208. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n07a868.1-14>
2. Aspinen S, Kinnunen M, Harju J, Juvonen P, Selander T, Holopainen A, et al. Inflammatory response to surgical trauma in patients with minilaparotomy cholecystectomy versus laparoscopic cholecystectomy: a randomised multicentre study. Scand J Gastroenterol 2016 Jan; 51(6):739-744. <https://doi.org/10.3109/00365521.2015.1129436>
3. Zaidi N, Glover AR, Sidhu SB. The Covidien LigaSure Maryland Jaw Device. Expert Rev Med Devices. 2015 Nov; 12(2):151-155. <https://doi.org/10.1586/17434440.2015.985650>
4. Gardeweg S, Bockstahler B, Duprè G. Effect of multiple use and sterilization on sealing performance of bipolar vessel sealing devices. PLoS ONE. 2019 Aug; 14(8):e0221488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221488>
5. Hirota Y, Tsukada K, Nishio E, Yoshida M, Tada S, Udagawa Y. Postoperative adhesion formation after laparoscopic uterine horn resection in a porcine model: comparison of five instruments. J Laparoendosc Adv Surg Tech A. 2005 Dec; 15(6):581-585. <https://doi.org/10.1089/lap.2005.15.581>
6. Rivier P, Monnet E. Use of vessel sealant device for splenectomy in dogs. Veterinary Surgery. 2011 Jan; 40(1):102-105. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2010.00757.x>
7. Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. Vet J 2004 Jul; 168(1): 28-40. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00119-9](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00119-9)
8. Rubio CP, Schmidt SEM. Proteínas de fase aguda em cães: Possíveis aplicações em cirurgia. Vet. e Zootec 2014 Dez; 21(4):492-502. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/969>
9. Gulhar R, Ashraf MA, Jialal I. Physiology, Acute Phase Reactants. 2023 Apr 24. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 30137854.
10. Caetano Júnior EM, Vieira JP, Franco RMAMM, et al. Evaluation of systemic inflammatory responses in cholecystectomy by means of access. Single-port umbilical incision, transvaginal NOTES, laparoscopy and laparotomy. Acta Cir Bras 2015 Oct; 30:691-703. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502015010000000>
11. Liang J, Xing H, Chang Y. Thermal damage width and hemostatic effect of bipolar electrocoagulation, LigaSure, and Ultracision techniques on goat mesenteric vessels and optimal power for bipolar electrocoagulation. BMC Surg. 2019 Oct; 19(1):147. <https://doi.org/10.1186/s12893-019-0615-4>
12. Dumartinet C, Matres-Lorenzo L, Linsart A, Bernardé A, Bernard F. Comparison of conventional ligatures and a vessel sealing device for haemostasis during open ovariohysterectomy in rabbits. New Zealand Veterinary Journal, 2022 May; 70(5), 256–262. <https://doi.org/10.1080/00480169.2022.2079571>

13. Landman J, Kerbl K, Rehman J, Andreoni C, Humphrey PA, Collyer W, et al. Evaluation of a Vessel Sealing System, Bipolar Electrosurgery, Harmonic Scalpel, Titanium Clips, Endoscopic Gastrointestinal Anastomosis Vascular Staples and Sutures for Arterial and Venous Ligation in a Porcine Model. *Journal of Urology* [Internet]. 2003 Feb; 169(2):697–700. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)63995-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)63995-X)
14. Gotohda N, Yamanaka T, Saiura A, Uesaka K, Hashimoto M, Konishi M, et al. Impact of energy devices during liver parenchymal transection: a multicenter randomized controlled trial. *World J Surg* 2015 Jun; 39,1543–1549. <https://doi.org/10.1007/s00268-015-2967-y>
15. Gabryel P, Kasprzyk M, Roszak M, Campasi A, Smoliński S, Zieliński P, et al. Comparison of the LigaSure™ bipolar vessel sealer to monopolar electrocoagulation for thoracoscopic lobectomy and lymphadenectomy: a prospective randomized controlled trial. *Surg Endosc* 2023 Jun; 37(6):4449-4457. <https://doi.org/10.1007/s00464-023-09892-0>
16. Sari R, Sevinc A. The effects of laparoscopic cholecystectomy operation on C-reactive protein, hormones, and cytokines. *J Endocrinol Invest* 2004 Feb; 27:106-110. <https://doi.org/10.1007/BF03346253>
17. Chelladurai M, Macintyre SS, Kushner I. In vivo studies of serum C-reactive protein turnover in rabbits. *The Journal of Clinical Investigation*, 1983 Mar; 71(3), 604-610. <https://doi.org/10.1172/JCI110806>
18. Ishigaki, Y., Satoh, T. Experimental studies of a mandibular bone infection model in the rabbit. *Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1998 Apr; 42(4), 413-423. <https://doi.org/10.5794/jjoms.42.413>
19. Eckersall PD, Conner JG, Harvie J. An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Vet Res Commun* 1991;15:17-24. <https://doi.org/10.1007/BF00497786>
20. Puglisi F, De Fazio M, Capuano P, Verzillo F, Martines G. Funzioni immunitarie dopo colecistectomia laparoscopica [Immunologic functions after laparoscopic cholecystectomy]. *Chir Ital.* 2001 Sep-Oct;53(5):659-63. Italian. PMID: 11723897.
21. Li CG. Effect of surgical methods of cholecystectomy on immunity and stress reaction in patients with gallstones. *J Hainan Med Univ* 2016;22(21):36-39. Disponível em: [https://web.archive.org/web/20201125152838id\\_/http://www.hnykdxxb.com/PDF/201621/10.pdf](https://web.archive.org/web/20201125152838id_/http://www.hnykdxxb.com/PDF/201621/10.pdf)
22. Schietroma M, Giuliani A, Agnifili A, Lely L, Carlei F, Pescosolido A, Amicucci G. Colecistectomia tradizionale vs laparoscopica. Modificazioni del profilo coagulativo [Changes in blood coagulation, fibrinolysis and cytokine profile during laparoscopic and open cholecystectomy]. *Chir Ital.* 2008 Mar-Apr;60(2):179-88. Italian. PMID: 18689165.
23. Del Romero A, Cuervo B, Peláez P, Miguel L, Torres M, Yeste M, et al. Changes in acute phase proteins in bitches after laparoscopic, midline, and flank ovariectomy using the same method for hemostasis. *Animals* 2020 Nov;10(12):2223. <https://doi.org/10.3390/ani10122223>
24. Rudasill SE, Morales RR, Sanaiha Y, Sareh S, Antonios JW, Khoury H, et al. Predicting morbidity and mortality in laparoscopic cholecystectomy: preoperative serum albumin still matters. *Am J Surg* 2020 Aug; 220(2): 432-437. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2019.12.005>
25. Malek S, Sinclair E, Hosgood G, Moens NM, Baily T, Boston SE. Clinical findings and prognostic factors for dogs undergoing cholecystectomy for gall bladder mucocele. *Vet Surg* 2013 Jan; 42(2):418-426. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2012.01072.x>
26. Youn G, Waschak MJ, Kunkel KA, Gerard PD. Outcome of elective cholecystectomy for the treatment of gallbladder disease in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2018 Apr; 252(8):970-975. <https://doi.org/10.2460/javma.252.8.970>
27. Dixon FJ, Maurer PH, Deichmiller MP. Half-Lives of Homologous Serum Albumins in Several Species. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1953 Jun; 83(2):287-288. <https://doi.org/10.3181/00379727-83-20336>
28. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 2011 Jan-Mar; 3(1): 118-127. <https://doi.org/10.4103/2F0975-7406.76489>