

Efeito da transecção do parênquima hepático associada ou não à ligadura contralateral da veia porta na regeneração hepática

Transection of the hepatic parenchyma associated or not with the contralateral portal vein branch ligation and its effect in liver regeneration

Henrique de Aguiar Wiederkehr¹, Julio Cesar Wiederkehr², Luiz Martins Collaço¹, Eros Luiz de Sousa¹, Paolo Salvalaggio³, Caroline Aragão de Carvalho¹, Barbara de Aguiar Wiederkehr⁴, Camila Aparecida Moraes Marques², Francielle França da Rosa⁵, Felipe de Negreiros Nanni⁶, Taíse Fuchs¹

RESUMO

Objetivo: Analisar a influência da ligadura da tributária da veia porta no estímulo regenerativo hepático por meio de critérios imunohistoquímicos. **Métodos:** Dez suínos, divididos em dois grupos de cinco animais, foram submetidos à hepatectomia em dois estágios, sendo que os grupos foram diferenciados pela ligadura ou não da tributária da veia porta, responsável pela vascularização dos lobos lateral e medial esquerdos do fígado do suíno. Cinco dias após o procedimento, os animais foram reabordados para retirada de amostras hepáticas para posterior análise de histológica e imunohistoquímica com o marcador Ki67. **Resultados:** O grupo submetido à hepatectomia com ligadura vascular apresentou incremento de 4% aproximadamente de hepatócitos em processo de regeneração, bem como grande número de células de Kupffer e células inflamatórias, quando comparado ao controle. **Conclusão:** Em virtude da análise positiva da replicação celular observada por meio do marcador Ki67, pode-se observar que a ligadura de uma tributária da veia porta promoveu um maior estímulo de regeneração hepática, efeito observado com menor intensidade no grupo submetido apenas à ressecção hepática.

Descritores: Hepatectomia; Regeneração hepática; Suínos

ABSTRACT

Objective: To analyze the influence of portal vein ligation in hepatic regeneration by immunohistochemical criteria. **Methods:** Ten pigs

divided into two groups of five animals underwent hepatectomy in two stages, and the groups were differentiated by ligation or not of the left portal vein tributary, which is responsible for vascularization of the left lateral and medial lobes of the pig liver. Five days after the procedure, the animals underwent liver biopsies for further analysis of histological and immunohistochemical with marker Ki67. **Results:** The group submitted to hepatectomy with vascular ligation showed an increase of approximately 4% of hepatocytes in regeneration status, as well as a greater presence of Kupffer and inflammatory cells as compared to control. **Conclusion:** As a result of positive cell replication observed through the Ki67 marker, we can suspect that the ligation of a tributary of the portal vein associated with liver resection promoted a greater stimulus of liver regeneration when compared to liver resection alone.

Keywords: Hepatectomy; Liver regeneration; Swine

INTRODUÇÃO

O hepatócito é uma célula de natureza epitelial, altamente diferenciada, que raramente se divide. Apenas um hepatócito entre 20 mil pode estar se dividindo em algum momento durante a vida do ser humano ou animal, sendo que esta divisão pode ocorrer, no máximo, uma ou duas vezes para cada célula e, diante disto, sa-

¹ Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

² Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

³ Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Curitiba, PR, Brasil.

⁵ Hospital Pequeno Príncipe, Curitiba, PR, Brasil.

⁶ Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Autor correspondente: Henrique de Aguiar Wiederkehr – Rua da Paz, 195 – Sala 508 – CEP: 80060-160 – Curitiba, PR, Brasil – Tel.: (41) 3262-9522 – E-mail: henrique.wie@hotmail.com

Data de submissão: 12/8/2016 – Data de aceite: 10/1/2017

Conflitos de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082017AO3831

be-se que uma das características do tecido hepático é apresentar reduzida reprodução celular.⁽¹⁻³⁾

A proliferação hepatocitária pode ser estimulada por diferentes fatores, entre os quais se destaca a destruição do fígado por trauma ou infecção.⁽⁴⁾ Cerca de 30% do parênquima hepático normal é compatível com a sobrevivência e manutenção das funções hepáticas, e até 20% do remanescente hepático é capaz de regenerar um fígado no tamanho do espaço em que ele se encontra. Esta recuperação decorre do aumento do tamanho das células hepáticas (hipertrofia), aliado a uma rápida divisão e multiplicação celular (hiperplasia).⁽⁴⁾ Tais características permitem hepatectomias repetidas, desde que complicações sejam evitadas. Durante a proliferação de hepatócitos, ocorre liberação de fatores de crescimento, como fator de crescimento do hepatócito (HGF), fator de crescimento transformador-alfa (α -TGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), os quais determinam estímulo mitogênico, que atinge outras células hepáticas e, desta forma, propicia a regeneração do tecido.^(5,6)

Eventos relacionados à regeneração do tecido hepático vêm sendo descritos desde a Grécia antiga, onde relatou-se a regeneração hepática por meio do mito de Prometeu, que foi condenado a alimentar diariamente uma águia com parte de seu fígado. No entanto, durante à noite, seu fígado regenerava, fornecendo ao pássaro eterno alimento e, a Prometeu, eterna tortura.⁽⁶⁾

O primeiro modelo experimental bem-sucedido para o estudo da regeneração hepática foi introduzido por Higgins e Anderson, em 1931. Este modelo contemplou a remoção cirúrgica dos lóbulos lateral esquerdo e mediano do fígado de ratos, constituindo aproximadamente 67 a 70% da massa hepática total destes animais.^(7,8) Desde a primeira ressecção de fígado realizada por Langenbuch, em 1888, e do primeiro transplante de fígado realizado por Starzl, em 1963, até atualmente, a cirurgia do fígado apresentou grande avanço, permitindo que extensas ressecções e transplantes de partes do fígado sejam possíveis.⁽⁹⁾ Isso se deve graças, entre outros fatores, ao reconhecimento da grande capacidade regenerativa do fígado.

Nos últimos anos, diversos estudos procuram descobrir o ponto inicial do processo regenerativo hepático. Alguns mostraram que os hepatócitos são transferidos para o tecido extra-hepático, ocorrendo síntese de DNA no novo tecido. Estes experimentos evidenciam que os sinais mitogênicos para hepatócitos são sistêmicos e, durante este processo que ocorre na regeneração, observa-se a expressão de proto-oncogenes relacionados com o ciclo celular, não apenas no processo de regeneração hepática, mas também na proliferação de ou-

tros tipos celulares, e eles são ativados imediatamente após a hepatectomia. Há algumas alterações durante a regeneração hepática, como acúmulo de triglicerídeos, elevação de isoenzimas fetais e aumento dos níveis enzimáticos relacionados com a síntese de DNA, como a timidina quinase e a ornitina descarboxilase.⁽¹⁾

O Ki67 é uma proteína que atua como um marcador da proliferação celular encontrado somente durante a divisão celular (fases G1, S, G2 e M do ciclo celular). Durante a interfase, o antígeno pode ser detectado exclusivamente dentro do núcleo, enquanto que, na mitose, a maior parte da proteína é deslocada para a superfície dos cromossomos. Por isto é considerado um excelente marcador para determinar o crescimento celular relacionado ao câncer e a outros quadros que envolvam mecanismos de regeneração.⁽⁹⁾

A ressecção cirúrgica, muitas vezes, é a única opção terapêutica potencialmente curativa para pacientes com doença maligna hepática primária ou metastática. Entretanto, esta ressecção é limitada pela necessidade de preservar um volume de fígado remanescente suficiente, visto que uma ressecção excessiva pode levar à falência hepática poucos dias após o procedimento cirúrgico.^(10,11)

Para evitar esta complicação, recomenda-se um futuro fígado remanescente (FFR) de aproximadamente 25% do volume total de fígado (VTF), no caso de a função hepática estar normal, e, em pacientes submetidos à quimioterapia, a recomendação é de um FFR de aproximadamente 40% do VTF.⁽¹²⁾

O conhecimento de que o volume de fígado remanescente é um fator limitante muito importante para a realização de grandes ressecções hepáticas estimulou a criação de novas táticas e técnicas para prevenir a insuficiência hepática pós-operatória.⁽¹³⁾ No início de 1990, Makuuchi et al., introduziu a técnica de embolização da veia porta (EVP) como um método para induzir a hipertrofia do FFR. Logo depois, outros autores introduziram diversas técnicas, que combinavam oclusão da veia porta com hepatectomias em estágios.⁽¹³⁻¹⁷⁾

Uma nova estratégia para pacientes com tumores hepáticos marginalmente ressecáveis, anteriormente considerados irressecáveis, foi formalmente relatada por Baumgart et al.,⁽¹⁸⁾ originalmente desenvolvida por Hans Schlitt.⁽¹⁹⁾ Esta técnica consiste em uma hepatectomia em dois estágios, com ligadura da veia porta e divisão *in situ* do parênquima hepático, e é conhecida como *Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy* (ALPPS). Esta técnica permite uma ressecção em pacientes com tumores hepáticos grandes ou múltiplos, que seriam de alto risco de insuficiência hepática pós-operatória, devido a um pequeno FFR.⁽²⁰⁾

OBJETIVO

Analisar a influência da ligadura da tributária da veia porta no estímulo regenerativo hepático por meio de critérios imunoistoquímica.

MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o preconizado pela Comissão Científica e pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba (PR), aprovados sob o número 3893/2014. Todos os animais receberam cuidados de acordo com as normas de legislação brasileira para ética em estudo animal (lei 11.794, decreto 6.899/2009).

Procedimento cirúrgico

A técnica anestésica utilizada foi anestesia geral inalatória, utilizando um sistema fechado, e o procedimento cirúrgico de hepatectomia em dois estágios com ligadura de veia porta, ALPPS, foi baseado no modelo descrito por Croome et al.⁽²⁰⁾

A primeira parte do estudo envolveu dois suínos e teve por objetivo verificar se a técnica era factível e podia ser reproduzida. Além disto, procurou-se estudar a divisão e a vascularização hepática, para melhor planejamento do procedimento cirúrgico.

O fígado suíno é composto por um lobo lateral direito (LD), lobo medial direito (MD), lobo medial esquerdo (ME), lobo lateral esquerdo (LE) e lobo caudado. A veia cava suína é intra-hepática e está localizada à direita do fígado.

No projeto teórico inicial, o objetivo era utilizar o padrão técnico do ALPPS realizado em humanos. No entanto, diante dos desafios encontrados em ressecar o parênquima sem causar danos a grandes vasos, na tentativa de execução de uma hepatectomia esquerda estendida, e diante dos recursos escassos, optou-se por, diferentemente do modelo citado, realizar apenas uma hepatotomia parcial entre os lobos MD e ME, de modo a isolá-los o mais profundamente possível, a fim de minimizar a perda sanguínea e o estresse cirúrgico causado por um tempo cirúrgico estendido.

A segunda parte do estudo foi dividida em duas fases. A primeira fase consistiu na realização do equivalente estágio 1 do ALPPS, no qual dez animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Houve randomização dos animais submetidos à ligadura, de modo a formar dois grupos: Grupo A (suínos 1 ao 5), em que os animais foram submetidos à hepatotomia modificada sem ligadura vascular; e Grupo B (suínos 6 ao 10), em

que os animais foram submetidos à hepatotomia modificada com ligadura do ramo portal responsável pela vascularização dos lobos lateral e medial esquerdos do fígado do suíno.

A ligadura vascular foi planejada com base na ilustração do artigo de base,⁽²⁰⁾ de modo que se optou por ligar o ramo esquerdo da veia porta, logo após sua bifurcação, isolando o suprimento sanguíneo apenas dos lobos ME e LE (Figura 1). A ressecção do parênquima hepático se deu com a utilização de um bisturi ultrassônico. Foram colhidas amostras do parênquima hepático e de sangue, para confecção de parâmetros laboratoriais e posterior comparação com o pós-operatório.

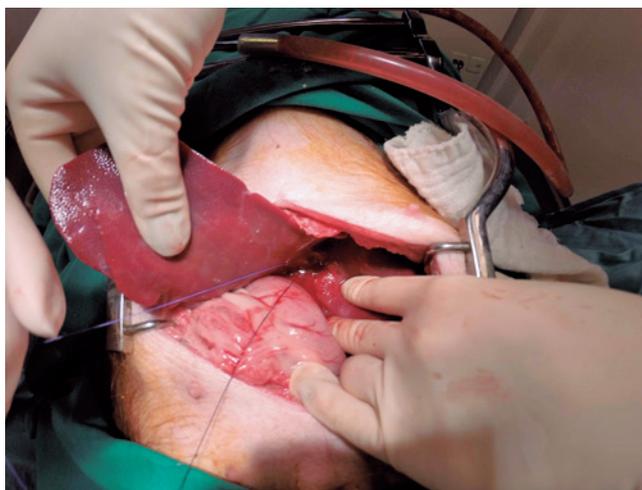


Figura 1. Ligadura do ramo da veia porta responsável pela vascularização dos segmentos medial e lateral do lobo esquerdo

Na segunda fase, os mesmos animais foram reabordados após 5 dias de pós-operatório do procedimento cirúrgico. Foram retiradas novas amostras hepáticas para posteriores análises histopatológica e imunoistoquímica, além do sangue para panorama laboratorial. Após o término do procedimento, os animais foram eutanasiados por meio de overdose anestésica com tiopental, na dose de 50mg/kg, segundo recomendação do guia brasileiro de boas práticas para a eutanásia de animais.

Avaliação bioquímica

A partir da amostra de sangue, foi realizado um hemograma completo, para avaliar a contagem de plaquetas, de eritrócitos e leucócitos por meio de contador hematológico automatizado por método de citometria de fluxo, realizado em laboratório terceirizado (Citolab, Curitiba-PR Brasil).

Avaliação histológica

Para a realização do estudo histológico, os órgãos coletados foram fixados em formol a 10% em PBS 0,1M (pH 7,4). Após, foram coletados fragmentos para processamento segundo técnica histológica convencional. Os fragmentos dos órgãos foram incluídos em paraplast e orientados para que os cortes obtidos resultassem em seções transversais do órgão. Posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e observados em microscopia de luz, para avaliação dos seguintes parâmetros: presença de fibrose, proliferação de ductos biliares, presença ou ausência de infiltrado inflamatório, esteatose e degeneração hidrópica.

Para avaliar a quantificação da fibrose, foi criado um método baseado no sistema de classificação de fibrose em humanos ISHAK, METAVIR e Sociedade Brasileira de Patologia (SBP). Este sistema de pontuação se baseou em quatro critérios:

Estágio zero: padrão de colageinização normal/sem fibrose.

- Estágio 1 ou +: septos fibrosos finos.
- Estágio 2 ou ++: septos fibrosos largos.
- Estágio 3 ou +++: septos fibrosos largos com penetração em parênquima hepático alterando a anatomia.

Quanto à proliferação ductal, o seguinte sistema de pontuação foi utilizado:

- Normal ou +: um a três ductos.
- Moderada ou ++: quatro a seis ductos.
- Intensa ou +++: mais de seis ductos.

A presença de infiltrado inflamatório, esteatose e degeneração hidrópica foi registrada como presença ou ausência destes critérios.

A avaliação histopatológica foi realizada por profissional capacitado, devidamente treinado e certificado em patologia, cego à intervenção realizada previamente.

Avaliação imunoistoquímica com Ki67

Para a análise imunoistoquímica, os cortes do tecido (4µm de espessura) foram embebidos em formalina e fixados em parafina, tendo sido submetidos à técnica de imunoistoquímica. A técnica consiste nas seguintes etapas: desparafinização, reidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio de reações inespecíficas. O anticorpo primário foi incubado por 12 horas a 4°C, conforme diluição específica indicada na bula de cada anticorpo utilizado. Após, foi aplicado o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB®, DAKO), foi feita revelação com cromógeno

diaminobenzidina tetrahydrocloro (kit DAB, DAKO) e realizado contrastado com hematoxilina 3%. O anticorpo utilizado foi Ki67 (1:200 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), avaliado em tecido hepático por patologistas.

A análise das lâminas baseou-se na intensidade do imunomarcador. O número de hepatócitos marcados positivamente pelo Ki67 foi determinado por contagem manual em cinco campos visuais aleatórios em aumento de 10x por profissional cego à intervenção realizada.

Análise estatística

Foram calculados médias e erro padrão da média, e foi aplicado o teste de Wilcoxon pareado. O teste estatístico foi aplicado para os valores obtidos nas análises laboratoriais, com significância de valor de $p < 0,05$. Para realização da análise estatística, foi utilizado o programa GraphPad Prism, versão 14.0 (*Statistical Package for Social Science*, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

RESULTADOS

A avaliação estatística dos valores observados para hemoglobina, hematócrito e contagem de plaquetas não demonstrou diferença significativa entre os períodos antes e depois nos Grupos A e B. A análise estatística dos valores obtidos para contagem de leucócitos nos Grupos A e B apresentou diferença significativa, com valor de p de 0,0061 e 0,0437, respectivamente (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Valores obtidos na realização de hemograma no Grupo A (submetido à hepatotomia sem ligadura vascular)

Variável	Média	Desvio padrão	Valor de p
Hemoglobina (g/dL)			
Antes	12,10	1,177	0,6227
Depois	12,36	1,274	
Hematócrito (%)			
Antes	36,40	3,507	0,8843
Depois	36,00	4,690	
Leucócitos (células/µL)			
Antes	14,290	2,149	0,0061*
Depois	7,500	1,118	
Plaquetas (células/µL)			
Antes	46,300	81,210	0,6938
Depois	479,200	48,849	

* $p < 0,05$.

Tabela 2. Valores obtidos na realização de hemograma no Grupo B (submetido à hepatomia com ligadura vascular)

Variável	Média	Desvio padrão	Valor de p
Hemoglobina (g/dL)			
Antes	11,16	2,344	0,3879
Depois	10,24	1,486	
Hematócrito (%)			
Antes	33,60	7,021	0,3820
Depois	30,80	4,550	
Leucócitos (células/ μ L)			
Antes	8,590	1,746	0,0437*
Depois	4,930	1,178	
Plaquetas (células/ μ L)			
Antes	598,000	43,675	0,1035
Depois	554,000	78,374	

* p<0,05.

A avaliação estatística dos valores observados para tempo de protrombina ativada (TAP), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), bilirrubina total e bilirrubina direta não demonstrou diferença significativa antes e depois nos Grupos A e B. A análise dos valores obtidos para transaminase glutâmica oxalacética (TGO) não apresentou diferença significativa antes e depois no Grupo A e apresentou diferença significativa de 0,009 no Grupo B (Tabelas 2, 3 e 4).

Outro parâmetro avaliado nos animais submetidos à ligadura vascular (Grupo B) foi uma intensa congestão vascular. Além disto, nos suínos 7 e 9, pertencentes ao Grupo B, observou-se um padrão sugestivo de degeneração hidrópica (Tabela 5).

Tabela 3. Valores obtidos na realização dos exames para avaliação da função hepática no Grupo A

Variável	Média	Desvio padrão	Valor de p
TAP (segundos)			
Antes	7,06	0,53	0,0635
Depois	8,18	0,53	
TGO (U/L)			
Antes	60,1	39,290	0,1790
Depois	31,22	3,263	
TGP (U/L)			
Antes	42,90	9,12	0,0945
Depois	53,66	8,81	
Bilirrubina total (mg/dL)			
Antes	0,20	0	nc
Depois	0,20	0	
Bilirrubina direta (mg/dL)			
Antes	0,1	0	nc
Depois	0,1	0	

Valores antes e depois não apresentam diferença.

TAP: tempo de protrombina ativada; TGO: transaminase glutâmica oxalacética; TGP: transaminase glutâmica pirúvica; nc: não calculado.

Tabela 4. Valores obtidos na realização dos exames para avaliação da função hepática no Grupo B

Variável	Média	Desvio padrão	Valor de p
TAP (segundos)			
Antes	7,14	0,71	0,6268
Depois	7,30	0,45	
TGO (U/L)			
Antes	103,1	68,72	0,1674
Depois	59,56	34,44	
TGP (U/L)			
Antes	71,30	11,36	0,009*
Depois	58,12	7,10	
Bilirrubina total (mg/dL)			
Antes	0,20	0	0,0993
Depois	0,28	0,08	
Bilirrubina direta (mg/dL)			
Antes	0,14	0,05	0,7040
Depois	0,16	0,09	

* p<0,05.

TAP: tempo de protrombina ativada; TGO: transaminase glutâmica oxalacética; TGP: transaminase glutâmica pirúvica.

Tabela 5. Avaliação histológica de tecido hepático dos Grupos A e B corado com hematoxilina-eosina

Suíno	Fibrose	Proliferação ductal	Infiltrado inflamatório	Esteatose hepática	Degeneração hidrópica
1					
Antes	+	+	Ø	Ø	Ø
Depois	+	+	Ø	Ø	Ø
2					
Antes	++	+	Presente	Ø	Ø
Depois	+	+	Ø	Ø	Ø
3					
Antes	++	+	Ø	Presente	Ø
Depois	++	++	Ø	Ø	Ø
4					
Antes	+	+	Ø	Ø	Ø
Depois	+	+	Ø	Ø	Ø
5					
Antes	+	+	Ø	Presente	Ø
Depois	++	++	Presente	Ø	Ø
6					
Antes	+	+	Ø	Ø	Ø
Depois	0	+	Ø	Ø	Ø
7					
Antes	0	+	Ø	Ø	Ø
Depois	+	++	Ø	Ø	Presente
8					
Antes	0	+	Ø	Ø	Ø
Depois	+	+	Ø	Ø	Ø
9					
Antes	+	+	Ø	Ø	Presente
Depois	+	+	Ø	Ø	Ø
10					
Antes	0	+	Ø	Ø	Ø
Depois	+	+	Presente	Ø	Ø

Classificação de fibrose: zero, se padrão de colagemização normal/sem fibrose; + se septos fibrosos finos; ++ se septos fibrosos largos. Classificação proliferação ductal: + se um a três ductos; ++ se quatro a seis ductos; Ø: ausente.

Nos suínos 3 e 4 pertencentes ao Grupo A, foram visualizados achados sugestivos de esteatose hepática prévia ao procedimento. O infiltrado inflamatório foi observado em apenas dois dos animais após o procedimento, sendo um do Grupo A e outro do Grupo B, e sua constituição era basicamente de monomorfonucleares (Tabela 5).

Os resultados relativos à proliferação dos hepatócitos comparados antes e depois do procedimento podem ser observados na tabela 6. No Grupo B houve diferença significativa entre o número de hepatócitos marcados antes e depois do procedimento ($p=0,0002$).

Tabela 6. Número de hepatócitos marcados positivamente pelo Ki67, determinado por contagem manual em cinco campos visuais aleatórios utilizando aumento de 10x

Grupo	Média (%)	Desvio padrão (%)	Valor de p
A antes	2,6	3,578	0,4543
A depois	1,2	0,837	
B antes	3,8	3,347	0,0002*
B depois	7,8	3,347	

* $p<0,05$.

DISCUSSÃO

Um dos principais estímulos à regeneração hepática é a própria ressecção do parênquima, visto que o fígado pós-hepatectomia apresenta um espectro de regeneração que raramente se encontra em fígados saudáveis.

Após a ressecção hepática, o fígado residual desenvolve-se e estabelece um estado de hiperplasia com alta proliferação de hepatócitos, células endoteliais e células de Kupffer. Estas, por sua vez, apresentam um papel de suma importância para a regeneração hepática, pois, a partir do fator de necrose tumoral alfa e da interleucina 6, estimulam os hepatócitos a entrarem na fase G1 da replicação celular.^(21,22) A dúvida que permanece se relaciona a qual seria o estímulo fisiológico para esta replicação celular.

Hipóteses como a alta demanda energética gerada devido ao estresse causado pela lesão mecânica⁽²³⁾ ou até mesmo um desequilíbrio entre os fatores hemodinâmicos⁽²⁴⁾ vem sendo estudadas e podem representar um novo paradigma no estudo da regeneração hepática.

Dentre eles, pode-se destacar uma nova técnica que vem sendo cada vez mais estudada, a qual consiste na hepatectomia em dois estágios com ligadura de veia porta, conhecida pela sigla ALPPS. Primeiramente descrita por Schnitzbauer et al., esta técnica representou uma nova alternativa para ressecção de tumores extensos. Ela induziu uma hipertrofia e a regeneração hepá-

tica em média de 74% dos casos;⁽²⁵⁾ – resultados superiores aos das técnicas de ligadura de veia porta isolada ou embolização da mesma.

Resultados semelhantes também foram descritos por Wiederkehr et al.⁽¹⁰⁾ em crianças portadoras de hepatoblastoma de grande extensão, em que a ressecção cirúrgica representava um grande risco de insuficiência hepática, devido ao pequeno tamanho do FFR. Nesta série de casos, foi observada regeneração hepática média de 72,56%, mostrando possível nova aplicação desta técnica.⁽¹⁰⁾

Esta técnica, em virtude de seus resultados, suscitou a hipótese de que o redirecionamento do fluxo vascular pela ligadura da veia porta no primeiro estágio, sem a consequente retirada do lobo hepático em questão, poderia exercer um fator importante na regeneração hepática. A partir desta hipótese, procurou-se verificar o real papel da ligadura vascular na regeneração hepática.

Após analisar e comparar a taxa de regeneração hepática entre os grupos nota-se que o Grupo B, o qual fora submetido à ressecção hepática combinada com a ligadura vascular, apresentou, histologicamente e na análise imunoistoquímica com Ki67, um aumento significativo de novos hepatócitos em processo de regeneração, bem como a presença também de células de Kupffer e células inflamatórias, resultado este em conformidade com o de outros artigos, em que se verificou, a partir de outros métodos, que esta técnica promove uma maior regeneração hepática.^(1,19,25)

Deste modo, pode-se afirmar que a técnica, de fato, promove um estímulo maior, quando comparado com a ressecção hepática isolada. Este fato é uma consequência da alta taxa de proliferação de hepatócitos e de células de Kupffer, que exercem um papel secundário na regeneração hepática.

A explicação para as baixas taxas de regeneração hepática no Grupo A, como pode ser observado na figura 2, correspondente ao fragmento hepático do suíno 2 antes do procedimento cirúrgico, e na figura 3, correspondente ao mesmo suíno após 5 dias da hepatectomia sem ligadura vascular, pode estar no fato de a ressecção hepática isolada não ter sido suficientemente significativa para estimular a regeneração hepática nesta região. Devido à anatomia do suíno apresentar a ramificação da veia portal intraparenquimatosa, a ressecção hepática se tornou tecnicamente mais complexa, devido ao risco de atingir um vaso de maior calibre com a ressecção, causando uma perda sanguínea maior do que os 500mL máximos suportados pelo animal.

Correlacionando ainda estes achados histopatológicos com os exames laboratoriais, não foi possível perce-

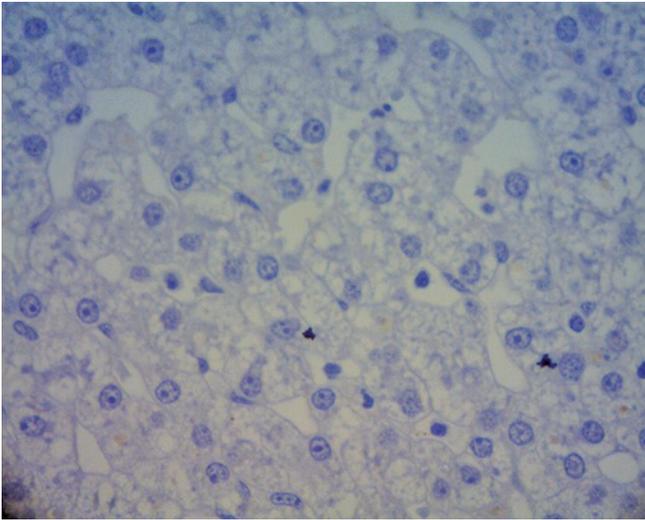


Figura 2. Fragmento hepático do suíno 2 antes do procedimento cirúrgico, sob aumento de 40x

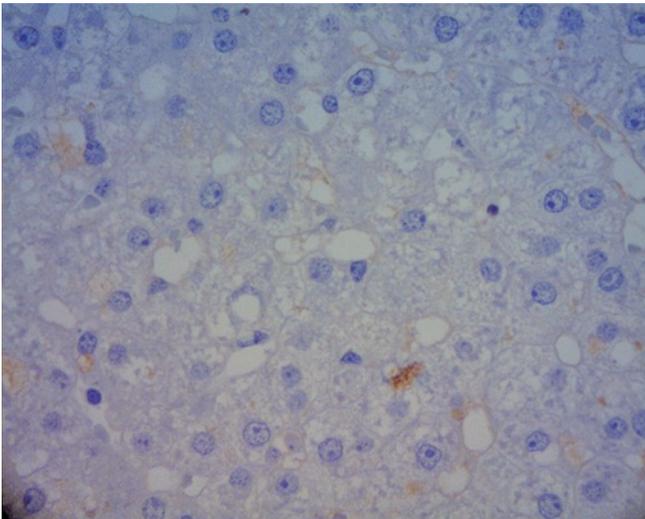


Figura 3. Fragmento hepático do suíno 2 após 5 dias da hepatectomia sem ligadura vascular, sob aumento de 40x, mostrando ausência de núcleos em proliferação

ber grandes alterações, seja de função hepática ou até mesmo no coagulograma de ambos os grupos, mostrando a segurança da técnica realizada. O valor de TGP aumentado no Grupo B pode estar relacionado com o procedimento cirúrgico, pois se trata de um marcador não específico, quando analisado separadamente. A TGO está presente também nas células dos músculos e do coração, enquanto que a TGP é encontrada quase que exclusivamente nas células hepáticas. Esta última é, portanto, muito mais específica para doenças do fígado que a TGO.

O número de leucócitos nos Grupo A e B teve uma diminuição estatisticamente significativa após o procedimento. A redistribuição circulatória dos leucócitos, principalmente dos linfócitos, é comum e geralmente

representa respostas transitórias a uma variedade de eventos que provocam estresse, como infecções bacterianas, cirurgia, trauma e hemorragia. Estas respostas podem ser mediadas por altos níveis de corticoides endógenos que induzem a queda nos linfócitos circulantes, podendo ser apresentado como uma possível causa da leucopenia aparente em ambos os grupos.^(26,27)

Considerando ainda que as ressecções hepáticas foram semelhantes nos dois grupos, pode-se avaliar que a ligadura do ramo da veia porta promoveu um estímulo maior de regeneração celular possivelmente relacionada ao desequilíbrio de fatores hematológicos e ao redirecionamento de fluxo sanguíneo para o lobo hepático contralateral, como observado na lâmina referente ao suíno 7, na qual é possível, após 5 dias, observar 5% a mais de hepatócitos em regeneração, se comparado ao material obtido no pré-operatório (Figura 4).

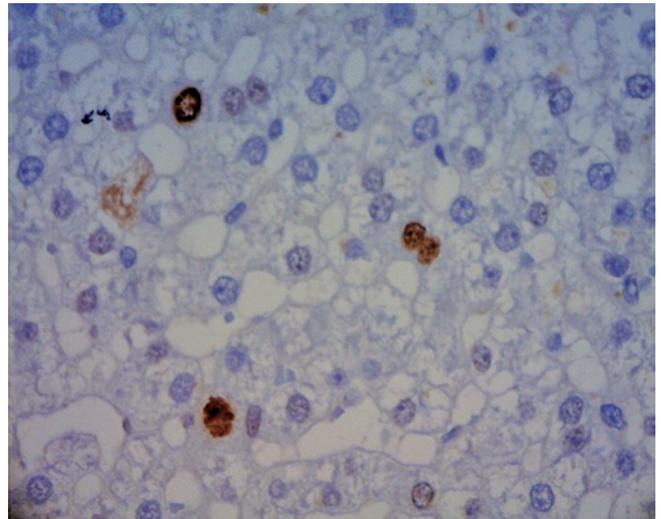


Figura 4. Fragmento hepático do suíno 7 dias após 5 dias da hepatectomia com ligadura do ramo portal, no aumento de 40x, mostrando grande quantidade de núcleos marcados com o Ki67

Croome et al.,⁽²⁰⁾ descreveram resultados semelhantes ao deste estudo. Após o segundo estágio do ALPPS, houve aumento do tamanho dos espaços porta nos suínos bem como do número de núcleos Ki67 positivos, indicando maior regeneração celular, apontando para o efeito da ligadura vascular na regeneração hepática.

CONCLUSÃO

Este estudo permitiu estabelecer uma possível alteração na técnica de hepatectomia em dois estágios com ligadura de veia porta, visto que fora realizada apenas a ligadura de uma de suas tributárias, mantendo-se a veia porta pária não interferindo na viabilidade e a função

do fígado do animal. Em virtude da análise positiva da replicação celular pelo marcador Ki67, a ligadura de uma tributária da veia porta promoveu um estímulo de regeneração hepática, efeito não observado no grupo submetido à ressecção hepática isolada, porém mais estudos são necessários, a fim de promover um melhor entendimento de como funciona este evento no tecido hepático.

REFERÊNCIAS

1. Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol*. 1997;26(4):945-52. Review.
2. Chandra S, Mehendale HM. Nutritional modulation of the final outcome of hepatotoxic injury by energy substrates: an hypothesis for the mechanism. *Med Hypotheses*. 1996;46(3):261-8. Erratum in: *Med Hypotheses*. 1996;46(5):488. Chandra S [corrected to Chanda S].
3. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J*. 1995;9(15):1527-36. Review.
4. Fletcher K, Orton TC, Chipman JK, Strain AJ. The response of hepatocytes isolated from phenobarbitone treated mice to mitogenic growth factors. *Arch Toxicol*. 1997;71(7):422-8.
5. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science*. 1997;276(5309):60-6. Review.
6. Pisto S, Morello D. Liver regeneration 7. Prometheus' myth revisited: transgenic mice as a powerful tool to study liver regeneration. *FASEB J*. 1996;10(8):819-28. Review.
7. Baratta B, Rizzoli R, Galliani I, Vitale M, Rizzi E, Matteucci A, et al. Early events of liver regeneration in rats: a multiparametric analysis. *Histochem Cell Biol*. 1996;105(1):61-9.
8. Yoshida S, Yunoki T, Aoyagi K, Ohta J, Ishibash N, Noake T, et al. Effect of glutamine supplement and hepatectomy on DNA and protein synthesis in the remnant liver. *J Surg Res*. 1995;59(4):475-81.
9. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-22. Review.
10. Wiederkehr JC, Avilla SG, Mattos E, Coelho IM, Ledesma JA, Conceição AF, et al. Associating liver partition with portal vein ligation and staged hepatectomy (ALPPS) for the treatment of liver tumors in children. *J Pediatr Surg*. 2015;50(7):1227-31.
11. Torres OJ, Moraes-Junior JM, Lima e Lima NC, Moraes AM. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): a new approach in liver resections. *Arq Bras Cir Dig*. 2012;25(4):290-2.
12. Shirabe K, Shimada M, Gion T, Hasegawa H, Takenaka K, Utsunomiya T, et al. Postoperative liver failure after major hepatic resection for hepatocellular carcinoma in the modern era with special reference to remnant liver volume. *J Am Coll Surg*. 1999;188(3):304-9.
13. Garcea G, Ong SL, Maddern GJ. Predicting liver failure following major hepatectomy. *Dig Liver Dis*. 2009;41(11):798-806. Review.
14. Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med*. 2007;356(15):1545-59. Review.
15. Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, Takayama T, Kosuge T, Gunvén P, et al. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery*. 1990;107(5):521-7.
16. Jaeck D, Oussoultzoglou E, Rosso E, Greget M, Weber JC, Bachellier P. A two-stage hepatectomy procedure combined with portal vein embolization to achieve curative resection for initially unresectable multiple and bilobar colorectal liver metastases. *Ann Surg*. 2004;240(6):1037-49; discussion 1049-51.
17. Kianmanesh R, Farges O, Abdalla EK, Sauvanet A, Ruszniewski P, Belghiti J. Right portal vein ligation: a new planned two-step all-surgical approach for complete resection of primary gastrointestinal tumors with multiple bilateral liver metastases. *J Am Coll Surg*. 2003;197(1):164-70.
18. Baumgart J, Lang S, Lang H. A new method for induction of liver hypertrophy prior to right trisectionectomy: a report of three cases. *HPB*. 2011;13(Suppl 2):71-2.
19. Alvarez FA, Ardiles V, Sanchez Claria R, Pekolj J, de Santibañes E. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): tips and tricks. *J Gastrointest Surg*. 2013;17(4):814-21.
20. Croome KP, Mao SA, Glorioso JM, Krishna M, Nyberg SL, Nagorney DM. Characterization of a porcine model for associating liver partition and portal vein ligation for a staged hepatectomy. *HPB (Oxford)*. 2015;17(12):1130-6.
21. Chen MF, Hwang TL, Hung CF. Human liver regeneration after major hepatectomy: a study of liver volume by computed tomography. *Ann Surg*. 1991;213(3):227-9.
22. Wakabayashi G, Shimazu M, Ueda M, Tanabe M, Kawachi S, Kitajima M. [Liver regeneration after resection: molecular and cellular mechanism]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 2004;105(10):650-3. Review. Japanese.
23. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science*. 1997;276(5309):60-6. Review.
24. Ibrahim S, Chen CL, Wang CC, Wang SH, Lin CC, Liu YW, et al. Liver regeneration and splenic enlargement in donors after living-donor liver transplantation. *World J Surg*. 2005;29(12):1658-66.
25. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA, et al. Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Ann Surg*. 2012;255(3):405-14.
26. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet*. 1963;117:659-76.
27. Grover C, Bagby Jr. Leukopenia and leukocytosis. In: Goldman L, Ausiello D, editors. *Medicine*. 23rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2008. p. 1098-106.