

Impacto da variação da pressão
portal após hepatectomia major:
Da repercussão clínica à
modulação do influxo portal
Jorge Humberto Carrapita

D 2024



Jorge Humberto Carrapita Impacto da variação da pressão
portal após hepatectomia major:
Da repercussão clínica à modulação do influxo portal

D.ICBAS 2024



Impacto da variação da pressão portal após hepatectomia major:
Da repercussão clínica à modulação do influxo portal
Jorge Humberto Gomes Carrapita



Jorge Carrapita

**Impacto da variação da pressão portal após hepatectomia major:
da repercussão clínica à modulação do influxo portal**

Ramo da especialização: Cirurgia hepática e biliar

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Médicas

Programa Doutoral da Universidade do Porto
(Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar)

Orientador – Doutor Jorge Maciel Barbosa
Categoria – professor catedrático
Afiliação - Universidade Fernando Pessoa.

Co-orientador (es)
Doutor José Guilherme Tralhão
Categoria – professor catedrático
Afiliação - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Doutor Jorge Nunes Santos
Categoria – Professor catedrático
Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da
Universidade do Porto

ÍNDICE

1. Resumo.....	3
2. Artigos publicados no âmbito da tese.....	8
3. Dedicatória	10
4. Agradecimentos.....	11
5. Lista de Abreviaturas	12
6. Introdução e contextualização do tema.....	15
6.1 A etiologia da falência hepática após hepatectomia e medidas profiláticas....	15
6.2 A patogénese do “small-for-size” e “falência hepática pós-hepatectomia”	18
6.3 A importância da pressão e fluxo venoso portal na génese da “síndrome small-for-size” e da “falência hepática pós-hepatectomia”	20
6.4 Modulação do influxo portal como factor protector da falência hepática após hepatectomia.....	25
6.5 Objectivo e interesse científico.....	37
7. Impacto da alteração da pressão venosa portal após hepatectomia major na citólise, função hepática e morbimortalidade.....	38
7.1 Introdução e objectivo.....	38
7.2 Material e métodos.....	39
7.3 Resultados.....	46
7.4 Discussão	51
7.5 Conclusão.....	53
8. Impacto da laqueação da artéria esplénica após hepatectomia major na modulação do influxo portal, no modelo murino	53
8.1 Introdução.....	53
8.2 Material e métodos.....	54
8.3 Resultados.....	66
8.4 Discussão.....	76
8.5 Conclusão.....	77
9. Discussão geral	78
10. Conclusão.....	79
11. Bibliografia	80
12. Anexos	97

1. Resumo

Introdução

A hepatectomia major é actualmente o tratamento standard de doenças benignas ou malignas do fígado. Com o intuito de melhorar o *outcome* após ressecção hepática major, conceitos como *small-for-size* e falência hepática após hepatectomia têm emergido nos últimos anos, baseados na premissa de que factores hemodinâmicos da circulação hepática, em particular a excessiva pressão venosa portal para o volume hepático remanescente, causariam lesão endotelial sinusoidal severa e, por consequência, disfunção hepática. Alguns estudos têm demonstrado a importância da pressão venosa portal no desenvolvimento de insuficiência hepática após hepatectomia major ou transplante hepático de dador vivo, quer em doentes com lesão hepática prévia, quer em fígados cirróticos. Estes estudos demonstraram que um desproporcionado aumento do fluxo venoso portal e da pressão venosa portal, gerado após hepatectomia major, leva a lesão sinusoidal e isquémica, devido à redução compensatória do fluxo arterial hepático, comprometendo a regeneração hepática.

No entanto, a metodologia usada nestes estudos e as respectivas conclusões denotam falta de uniformidade na definição dos objectivos, além de não considerarem o elevado número de factores influenciadores do outcome, promovendo a ocorrência de viés de confundimento.

Uma revisão sistemática recente elaborada pelo nosso grupo, não só sugere que os doentes que desenvolvem falência hepática após hepatectomia, exibem um aumento da pressão venosa portal após hepatectomia major, comparativamente aos doentes que não evidenciam esta síndrome, como reforça a importância da medição intra-operatória da pressão venosa portal. Além disso, a meta-análise conclui que a alteração da pressão venosa portal durante a hepatectomia é mais fidedigna a prever um aumento do risco de falência hepática após hepatectomia, do que uma medição isolada da pressão venosa portal após hepatectomia.

Standardizar a metodologia, definir o objectivo e determinar o *cut-off* acima do qual podemos prever com fiabilidade a ocorrência de falência hepática após a hepatectomia ou a síndrome *small-for size*, é uma necessidade primordial e abre portas à implementação de estratégias moduladoras do influxo portal. A modulação do influxo portal poderá condicionar no futuro a cirurgia de ressecção ou transplante hepático. Desde logo, poderá

permitir incluir doentes cuja disfunção e lesões hepáticas, condicionadas pela sua patologia de base ou pela terapêutica neo-adjuvante, as excluem actualmente de uma ressecção hepática major. Para além disso, poderá permitir utilizar enxertos hepáticos mais pequenos, sem risco acrescido de ocorrer a síndrome *small-for-size*, o que acarreta menor iatrogenia para o dador e possibilita aumentar o pool de dadores compatíveis. Por último, poderá aumentar a taxa de ressecabilidade na doença metastática, ao permitir reduzir o futuro remanescente hepático necessário para obviar a ocorrência de uma falência hepática após hepatectomia.

Considerando a fisiopatologia da lesão endotelial gerada pela elevação da pressão venosa portal, diversas estratégias têm sido propostas para modular o influxo portal. Desde logo, medidas farmacológicas e técnicas cirúrgicas têm sido testadas, não só isoladamente como em complementaridade. Apesar dos resultados promissores destas estratégias moduladoras de influxo portal, não se verificou um incremento significativo na sobrevida, revelaram um efeito inibitório sobre a regeneração hepática, o que limita a sua utilização em cirurgia hepática e demonstraram, em modelos animais, uma elevada taxa de morbilidade e mortalidade.

Objectivo

Na perspectiva clínica, pretende-se avaliar o impacto da alteração da pressão venosa portal após hepatectomia na citólise e função hepáticas e na morbimortalidade, considerando de forma mais ampla os factores envolvidos, nomeadamente a pressão venosa portal basal pré-hepatectomia e o grau de deterioração do parênquima hepático, causado por doença ou tratamentos concomitantes. De notar que os escassos estudos prévios não consideram de forma tão vasta os factores envolvidos, nomeadamente a alteração da pressão venosa portal durante a hepatectomia.

Na vertente experimental, intenta-se conhecer, de forma abrangente, os efeitos de uma manobra moduladora do influxo portal tecnicamente exequível e menos iatrogénica do que as outras estratégias já testadas. Para tal, propõe-se avaliar, em modelo murino, o impacto da laqueação da artéria esplénica associada à hepatectomia major, na função, regeneração e viabilidade hepatocelulares.

Estudo clínico

Material e métodos

Estudo observacional prospectivo, incluindo 30 doentes submetidos a medição intra-operatória da pressão portal antes e após hepatectomia, relacionando esta alteração com a evolução clínica pós-operatória. Avaliação similar foi efectuada num grupo de controlo. Factores relacionados com o doente, doença e procedimento foram considerados. Determinou-se o valor ideal de incremento da pressão portal. Regressão linear ou logística foram aplicadas para identificar factores preditores de evolução clínica.

Resultados

A análise uni variada mostrou que um aumento de pressão portal após hepatectomia associa-se a deterioração da coagulação nos primeiros 30 dias após hepatectomia ($p < 0,05$), a complicações major ($p = 0,01$) como a falência hepática após hepatectomia ($p = 0,041$). A análise multivariada mostrou que um aumento de pressão portal ≥ 2 mmHg é um factor independente para a evolução clínica pós-operatória desfavorável.

Conclusão

Após hepatectomia, para além do remanescente hepático funcional, outros factores são responsáveis pela deterioração da função hepática e pela morbimortalidade, como o aumento da pressão venosa portal e a exposição prévia a quimioterapia. A elevação de pressão venosa portal ≥ 2 mmHg durante a hepatectomia agrava a deterioração da função de coagulação hepática nos primeiros 5 dias pós-operatórios e acarreta um risco acrescido de ocorrência de complicações major.

Estudo animal

Material e métodos

58 ratos Wistar (machos, 2 meses) foram sujeitos a hepatectomia de 85% com ou sem laqueação da artéria esplénica associada. No pós-operatório, em ambos os grupos, foram avaliadas às 24, 48, 72 e 120h: função hepática, regeneração hepatocelular e viabilidade. Para comparação foram efectuados testes *Mann-Whitney* / T-independentes e análise de variância *Kruskal-Wallis* para alterações ao longo do tempo; Correção *Bonferroni* nas comparações múltiplas.

Resultados

A laqueação da artéria esplénica incrementa a viabilidade hepatocitária às 24h, induz relativo decréscimo do stresse oxidativo nas primeiras 48h, promove capacidade antioxidante a partir das 24h, acarreta um ligeiro défice temporário da função de extracção hepatocitária nas primeiras 72 horas e aumenta o índice mitótico entre as 48 e 72h.

Conclusão

A hepatectomia major associada à laqueação da artéria esplénica, no modelo murino, permite a modulação da pressão venosa portal, promovendo um aumento da viabilidade e da regeneração hepáticas, sem comprometer a função, ao induzir um stresse oxidativo menos expressivo nas primeiras 48h.

Abstract

Major hepatectomy is currently the standard treatment for benign or malignant liver diseases. With the aim of improving the outcome after major hepatic resection, concepts such as small-for-size and post-hepatectomy liver failure have emerged in recent years, based on the premise that hemodynamic factors of the hepatic circulation, in particular excessive portal venous pressure to the remaining liver volume would cause severe sinusoidal endothelial injury and, consequently, liver dysfunction. Excessive portal venous pressure in the liver remnant is an independent factor in the occurrence of post hepatectomy liver failure and small-for-size syndrome. The baseline portal pressure prior to hepatectomy and other factors that may influence the outcome were not considered previously.

Several strategies have been proposed to modulate portal inflow. Despite the promising results of these portal inflow modulating strategies, there was no significant increase in survival, they revealed an inhibitory effect on liver regeneration, which limits their use in liver surgery and demonstrated, in animal models, a high rate of morbidity and mortality.

Clinical study: Portal venous pressure variation during hepatectomy – a prospective study.

Aim: to assess the impact of portal pressure change during hepatectomy on the patient outcome. Material and methods: Prospective observational study including 30 patients subjected to intraoperative measurement of portal pressure before and after hepatectomy. This variation was related to the patient outcome. Control group evaluation was assessed. Patient, disease and procedure features were considered. The optimal cut-off of portal pressure variation was determined. Linear regression or logistic regression was applied to identify predictors of the outcome. Results:

The univariate analysis showed that portal pressure increase after hepatectomy was associated with coagulation impairment in the first 30 postoperative days ($p < 0.05$), and with the occurrence of major complications ($p = 0.01$), namely hepatic failure ($p = 0.041$). The multivariate analysis showed that portal venous pressure increase ≥ 2 mmHg is an independent factor for worse outcomes. Conclusion: Patient outcomes are influenced by the portal venous pressure increase: an increment ≥ 2 mmHg after hepatectomy seems to increase the risk of major complications.

Animal study: Impact of splenic artery ligation after major hepatectomy on liver function, regeneration and viability.

Aim: to investigate the impact of portal blood flow reduction by splenic artery ligation after major hepatectomy in a murine model. Material and methods: Fifty-eight rats were subjected to an 85% hepatectomy or 85% hepatectomy and splenic artery ligation. Both groups were evaluated at 24, 48, 72 and 120 post-operative hours: liver function, regeneration and viability. Results: Splenic artery ligation produces viability increase after 24 h, induces a relative decrease in oxidative stress during the first 48 hours, allows antioxidant capacity increment after 24 h, which is reflected in a decrease of half-time normalized liver curve at 48 h and at 72 h and in an increase of mitotic index between 48 h and 72 h. Conclusion: Splenic artery ligation combined with 85% hepatectomy in a murine model, allows portal inflow modulation, promoting an increase in hepatocellular viability and regeneration, without impairing the hepatic function, probably by inducing a less marked elevation of oxidative stress at first 48 hours.

2. Artigos publicados no âmbito da tese

- **Portal Pressure Impact on Clinical Outcome after Major Hepatectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis**

DOI: 10.21614/sgo-25-3-113

June 202

Surgery Gastroenterology and Oncology 25(3):113-120

Autores: Jorge Humberto Gomes Carrapita^{1,6*}, Ana Margarida Abrantes^{2,3,4,5}, Bernardo Sousa-Pinto^{7,8}, Jorge Nunes Santos⁶, Maria Filomena Botelho^{2,3,4,5}, José Guilherme Tralhão^{3,4,5,9}, Jorge Maciel Barbosa^{1,10}

¹General Surgery Department of Vila Nova de Gaia/Espinho Hospital, Portugal

²Biophysics Institute, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

³Clinical Academic Center of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁴Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) area of Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

⁵CNC.IBILI Consortium/Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal

⁶Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Oporto, Portugal

⁷MEDCIDS - Department of community Medicine, Information and Health decision Sciences, Faculty of Medicine, University of Oporto, Portugal

⁸CINTESIS - Center for health technology and Services Research, Oporto, Portugal

⁹Medicine School, University of Coimbra, Surgery A, Surgery Department of University Hospital (CHUC), Coimbra, Portugal

¹⁰Fernando Pessoa University, Oporto, Portugal

- **Portal Venous Pressure Variation during Hepatectomy: A Prospective Study**

DOI: 10.20344/amp.10892

Acta Médica Portuguesa Vol. 32 No. 6: 420–426

June 2019

Autores: Jorge Gomes Carrapita^{1,2}, Clara Rocha^{3,4}, Henrique Donato⁵, Alexandre Costa⁶, Ana Margarida Abrantes⁷, Jorge Nunes Santos¹, Maria Filomena Botelho⁷, José Guilherme Tralhão⁷, Jorge Maciel Barbosa^{8,9}

¹ Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto. Porto. Portugal.

² Serviço de Cirurgia Geral. Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia / Espinho. Vila Nova de Gaia. Portugal.

³ ESTESC-Coimbra Health School Department Complementary Sciences. Polytechnic Institute of Coimbra. Coimbra. Portugal.

⁴ Institute for Systems Engineering and Computers at Coimbra (INESCC). Coimbra. Portugal.

⁵ Radiology Department. Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Coimbra. Portugal.

⁶ General Surgery Department. Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia / Espinho. Vila Nova de Gaia. Portugal.

⁷ Biophysics Unit. Centre of Investigation on Environment, Genetics and Oncobiology (CIMAGO). Medical School. University of Coimbra. Coimbra. Portugal.

⁸ General Surgery Department. Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia / Espinho. Vila Nova de Gaia. Portugal.

⁹ Fernando Pessoa University. Porto. Portugal.

- **Impact of splenic artery ligation after major hepatectomy on liver function, regeneration and viability**

DOI: 10.1038/srep34731

Scientific reports / www.nature.com 6:34731

October 2016

Autores: Jorge Carrapita^{1,2}, Ana Margarida Abrantes^{3,4,5}, Sofia Campelos⁶, Ana Cristina Gonçalves^{4,5,7}, Dulce Cardoso⁸, Ana Bela Sarmento-Ribeiro^{4,5,7,9}, Clara Rocha^{10,11}, Jorge Nunes Santos², Maria Filomena Botelho^{3,4,5}, José Guilherme Tralhão^{3,4,5,12}, Olivier Farges¹³, Jorge Maciel Barbosa^{1,14}

¹General Surgery Department of Vila Nova de Gaia/Espinho Hospital, Portugal

²Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Oporto, Portugal

³Biophysics Institute, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

⁴CNC.IBILI, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

⁵Centre of Investigation on Environment, Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Portugal.

⁶Pathologic Anatomy Department of Vila Nova de Gaia/Espinho Hospital, Portugal

⁷Laboratory of Oncobiology and Hematology (LOH), University Clinic of Hematology and Applied Molecular Biology Unit, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

⁸Nuclear Medicine Department, University Hospital of Coimbra, Portugal

⁹Clinical Hematology Department, Coimbra University Hospital Centre (CHUC), Portugal

¹⁰ESTESC-Coimbra Health School Department Complementary Sciences, Polytechnic Institute of Coimbra, Portugal

¹¹Institute for Systems Engineering and Computers at Coimbra (INESCC), Portugal

¹²Surgery A, Surgery Department of Coimbra University Hospital, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

¹³Hepatobiliary and pancreatic unit, Beaujon Hospital, AP-HP, Université Paris Clichy, France

¹⁴Fernando Pessoa University, Oporto, Portugal.

3. Dedicatória

Aos meus filhos Natália e Guilherme

4. Agradecimentos

Aos meus orientadores, Srs. Professores Doutores Jorge Maciel, José Guilherme Tralhão e Jorge Nunes Santos, que tornaram este projecto possível, pela crítica, pelo apoio, pelo exemplo de dedicação, entrega e exigência como têm exercido a sua actividade médica.

Ao Sr. Professor Doutor Jorge Maciel, pelo contributo decisivo na minha formação, pelo exemplo de liderança e pela amizade que nos uniu.

Ao meu Serviço de Cirurgia Geral da Unidade Local de Saúde de Gaia / Espinho, em especial à unidade de Cirurgia hepato-bilio-pancreática, aos meus colegas e enfermeiros, pela dedicação a este projecto e pelo empenho na minha formação.

Ao Sr. Professor Doutor José Guilherme Tralhão e à *Association for Innovation and Biomedical Research on Light and Image* (AIBILI), na pessoa da Sra. Professora Doutora Filomena Botelho, pelo contributo decisivo na investigação experimental e pela motivação e crítica nos momentos decisivos do projecto.

Ao Sr. Professor Doutor Jorge Nunes Santos, pelo contributo essencial na interligação com o ICBAS e pelo empenho, decisivo para a escolha da especialidade, com que participou na minha formação pré-graduada.

À Sra. Professora Doutora Margarida Abrantes, pela dedicação que entregou a este projecto e por toda a formação que me proporcionou na área da investigação experimental.

Aos meus pais, Natália e Francisco, a quem devo quase tudo o que conquistei.

À minha esposa, esteio, resiliência, companheirismo.

Aos meus tios Diamantino Gomes e Francisca Carrapita pelo rigor e competência, enquanto profissionais de saúde.

Aos meus avós, que me ensinaram que nada se conquista sem determinação para enfrentar as dificuldades.

5. Lista de Abreviaturas

^{99m}Tc-mebrofenina	Tecnécio-99m mebrofenina
ALBI	Score de albumina / bilirrubina
ALPPS	<i>Association liver partition and portal vein ligation</i>
An-V	Anexina V
BT	Bilirrubina total
CHOP	Proteína homóloga do factor de transcrição c/EBP
DCF	2'-7'-diclorofluoresceína
DCFH₂	2'-7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH₂-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DHE	Dihidroetídeo
DHL	Desidrogenase láctica
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
FA	Fosfatase alcalina
FEH	Fracção de extração hepatocitária
FHPH	Falência hepática pós - hepatectomia
FNT – α	Factor de necrose tumoral α
FRH	Futuro remanescente hepático
FSC	Forward scatter
Gd-EOB-DTPA	<i>Gadolinium ethoxybenzyl-diethylenetriaminepentaacetic acid</i>
GGT	Gamma-glutamyl transferase
GSH	Glutationa reduzida

HEPES	<i>4-2-Hydroxyethylpiperazine-1-ethane-sulfonic acid</i>
HM	Hepatectomia major
HO-1	Heme-oxigenase-1
HSP70	Proteínas heat-shock 70
Hx	Hepatectomia
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
INR	Índice internacional normalizado
IP	Iodeto de Propídeo
ISGLS	<i>International Study Group of Liver Surgery</i>
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol carbocianina
LAE	Laqueação da artéria esplénica
MEGX	Monoetilglicinexilidido
MELD	<i>Model-of-end-stage-liver-disease-score</i>
MIF	Média das intensidades de fluorescência
Mtx	Metástases
PBS	Tampão fosfato-salino
PGE₁	Prostaglandina E ₁
PVP	Pressão venosa portal
QT	Quimioterapia
Rbpi-23	<i>Bactericidal permeability increasing protein-23</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROIs	Regiões de interesse
SSC	<i>Side scatter</i>

SSFS	Síndrome <i>small-for-size</i>
T1/2	Tempo de redução a metade de actividade máxima, obtido na curva de excreção normalizada
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
THDV	Transplante hepático de dador vivo
TP	Taxa de protrombina
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHR	Volume hepático remanescente
VHTF	Volume hepático total funcional

6. Introdução e contextualização do tema

6.1 A etiologia da falência hepática após hepatectomia e medidas profiláticas

A hepatectomia major, tradicionalmente definida como a ressecção de 3 ou mais segmentos, é actualmente o tratamento standard de doenças benignas e malignas do fígado [1]

Por outro lado, o transplante hepático é actualmente o tratamento de escolha para o hepatocarcinoma confinado aos critérios de Milão [2] (**ANEXO I**) posteriormente alargados por outros grupos [3]. Mais recentemente o transplante hepático em dador vivo (THDV) surgiu como alternativa credível ao transplante de cadáver, permitindo aumentar o *pool* de dadores e consequentemente, diminuir os *drop-outs* das listas de espera [3].

De facto, nos últimos anos, tem-se verificado um incremento na sobrevida e mais aceitáveis taxas de morbimortalidade nos doentes submetidos a hepatectomia major ou transplante hepático[1,3,4]. Diversos factores têm sido implicados nesta melhoria de resultados da cirurgia hepática.

Um dos principais factores é a implementação de estratégias onco-cirúrgicas multidisciplinares na selecção e tratamento dos doentes, associada a uma maior eficácia da quimioterapia, nomeadamente a terapia monoclonal [1,3,5,6]. Além disso, a panóplia de instrumentos e técnicas utilizados no período per-operatório tem tornado a cirurgia hepática mais segura. Exemplos disso são:

- A estimativa mais precisa do futuro remanescente hepático (FRH) (definido pela percentagem de remanescente hepático funcional após hepatectomia), por tomografia computadorizada, sendo hoje aceitável realizar uma hepatectomia se o FRH for superior a 20%-35% em fígado saudável e superior a 40% em fígado cirrótico [7,8]. O transplante hepático de dador vivo é considerado seguro se a relação: volume do enxerto / volume do receptor for superior a 0,6% [9,10].
- A criteriosa selecção dos doentes candidatos a hepatectomia ou transplante. Com este objectivo, foram definidos scores, como o *Child-pugh* [11] (**ANEXO II**) e “*model-of-end-stage-liver-disease score*” (MELD) (**ANEXO III**) [12], para avaliação de risco, na tentativa de prever complicações pós-operatórias major como a insuficiência hepática [3,9]. Hoje considera-se que a existência de um estágio C de cirrose hepática (classificação de Child-

Pugh) é contra-indicação relativa para cirurgia de ressecção. Além disso, considera-se que doentes com cirrose em estágio Child-Pugh B não toleram hepatectomia major com um FRH inferior a 30%. Adicionalmente, muitos estudos têm demonstrado que o MELD é um bom preditor de complicações após hepatectomia major, sendo que um MELD score superior a 10 aumenta significativamente o risco de ocorrer uma complicação pós-operatória major e de mortalidade, indicando que a ressecção major deve ser provavelmente evitada [3,8,9]. Mais recentemente, o *Score Albumina / Bilirrubina (ALBI)* (**ANEXO IV**) e as suas versões modificadas têm permitido uma acuidade superior na estimativa do *outcome* clínico pós-ressecção hepática por hepatocarcinoma, considerando-se actualmente um preditor fiável da sobrevida a curto e longo prazo dos doentes submetidos a tratamento potencialmente curativo de hepatocarcinoma [13]

- A utilização clínica de testes dinâmicos de avaliação da função hepática, suplantando as limitações dos testes convencionais, como sejam os testes de função metabólica, de que é exemplo o doseamento sérico da bilirrubina total (que reflecte a cascata enzimática da glucoronidação – fase II) e os testes de avaliação de síntese de que é exemplo a síntese de proteínas e factores de coagulação. Com efeito, os testes convencionais de estimativa da função hepática tornam-se patológicos numa fase tardia da progressão da doença e não reflectem em tempo real a capacidade de resistir a uma cirurgia de ressecção hepática [9]. A utilização de testes dinâmicos de avaliação da função hepática na prática clínica permitiu medir directamente o metabolismo com maior sensibilidade, detectando pequenas deteriorações da função mais precocemente. Os testes dinâmicos actualmente mais usados são a clearance do verde de indocianina [14], o teste monoetilglicinoxilidido (MEGX), a clearance de sorbitol [9], a fracção de extracção hepatocitária do ^{99m}Tc-mebrofenina determinada por testes radioisotópicos [15] e o teste respiratório da metacetina [13]. Um teste promissor, em fase de implementação, é a ressonância magnética nuclear (RMN) com *Gadoliniumethoxybenzyl-diethylenetriaminepentaacetic acid* (Gd-EOB-DTPA) que permitirá uma avaliação geográfica localizada da função hepática [13]
- A implementação de drenagem biliar pré-operatória em fígados colestáticos que tem reduzido drasticamente o risco pós-operatório de falência hepática [9,16].
- As medidas tomadas no período Intra-operatório que visam minorar as complicações e que têm evidenciado um reflexo positivo na recuperação após hepatectomia. Por exemplo, muitos estudos têm demonstrado que, em pacientes com boa função renal e hepática, uma

pressão venosa central < 5 mm Hg está associada a uma redução nas perdas hemáticas, com diminuição da necessidade de suporte transfusional, facilitando a ressecção e melhorando a recuperação pós-hepatectomia [9,17,18]. Nesta linha de conduta, novas técnicas cirúrgicas como o *anterior approach* e a manobra de *hanging* têm permitido reduzir a hemorragia intra-operatória e a mortalidade pós-operatória [3]. Outras medidas actualmente consideradas primordiais são a limitação temporal da manobra de *Pringle* e a clampagem pedicular selectiva, as quais revelaram obviar os efeitos deletérios no parênquima hepático, causados pela isquemia prolongada de uma clampagem total, particularmente em fígados cirróticos [9,19].

- A implementação de uma vigilância pós-operatória, especialmente em doentes com disfunção hepática, que constitui hoje um procedimento standard, designadamente a monitorização invasiva contínua da pressão arterial e da diurese, bem como a vigilância de perdas hemáticas ou biliares pela drenagem abdominal. Com efeito, a rápida identificação de hipotensão ou oligúria (diurese < 0,5 ml/Kg.h) e a sua etiologia permite uma atempada restituição hídrica, eventualmente complementada por vaso pressores e uma criteriosa administração de diuréticos [9]. Para além disto, o controlo seriado sérico de níveis electrolíticos, albuminemia, factores de coagulação e lactatos permite prevenir complicações catastróficas, como sejam a síndrome hepato-renal, a azotemia pré-renal, hemorragia e a falência hepática pós-operatória [9].

Contudo apesar deste avanço técnico, a mortalidade pós-hepatectomia continua a ser preocupante, sendo a insuficiência hepática a sua principal causa [1].

Uma limitação importante da estratégia terapêutica das neoplasias hepáticas é a percentagem de fígado remanescente funcional após hepatectomia [6,20]. A implementação de estratégias para incrementar a regeneração e obviar o aparecimento de falência hepática após hepatectomia major tem-se revelado promissora. Exemplos disso são a embolização portal selectiva efectuada antes de hepatectomia major, particularmente em doentes cirróticos [7] ou fígados expostos a stresse metabólico, designadamente a esteatose, a hepatopatia lipídica não alcoólica, a esteato-hepatite não alcoólica ou outras lesões induzidas por tratamentos neo-adjuvantes, como a quimioterapia, a radioterapia e a radio embolização [21,22]. Mais recentemente, foi confirmado o sucesso da embolização portal temporária, um procedimento seguro que permite incluir mais candidatos a embolização portal estendida a mais de 3 segmentos [23]. Outras estratégias fomentadoras da regeneração são a hepatectomia iterativa e as ressecções sequenciais, as quais têm

permitido atingir uma nova perspectiva na qual o factor limitante já não é o tamanho das lesões, mas sim o volume remanescente hepático após hepatectomia [20]. No entanto, investigação mais actual confirmou que após hepatectomia, o objectivo deverá ser a protecção da função do fígado remanescente, em vez de se focar na restituição do volume hepático. [8]

Com o intuito de melhorar o *outcome* após ressecção hepática major, conceitos como “small-for-size” e “falência hepática pós-hepatectomia” têm emergido nos últimos anos, baseados na premissa de que factores hemodinâmicos da circulação hepática, em particular a excessiva pressão venosa portal para o volume hepático remanescente, causariam lesão endotelial sinusoidal severa e, por consequência, disfunção hepática. [1,6,20]

6.2 A patogénese do “small-for-size” e “falência hepática pós-hepatectomia”

A síndrome de “falência hepática pós-hepatectomia” FHPH) surgiu para descrever o aparecimento de ascite refractária, coagulopatia, encefalopatia e morte por sépsis no período pós-hepatectomia major. Diversos estudos surgiram para antever esta catástrofe, através do estabelecimento de critérios de diagnóstico e de gravidade, baseados em marcadores bioquímicos, como os “critérios 50-50 ao 5º dia pós-operatório” (**ANEXO V**) [4], a graduação de severidade de *Schindl* [24] e a “definição/graduação da insuficiência hepática pós-hepatectomia do *International Study Group of Liver Surgery*” (ISGLS) (**ANEXO VI**) [25]. Muitos destes estudos têm sugerido que a insuficiência hepática após hepatectomia é motivada pelo reduzido volume hepático e pelas alterações hemodinâmicas que surgem após ressecção major. Apesar do fluxo venoso portal desempenhar um papel importante na regeneração hepática, estas rápidas alterações hemodinâmicas podem levar a um excessivo fluxo venoso portal ao fígado residual que gera hiperpressão venosa portal. Diversos factores têm sido propostos para a génese deste fenómeno. Um deles é a produção secundária de espécies reactivas de oxigénio e citocinas inflamatórias, induzida pelas alterações hemodinâmicas, e que, por si só, levam à necrose e apoptose hepatocitária. Outro factor apontado é a excessiva força deformadora que a hiperpressão venosa portal exerce sobre as paredes da estrutura capilar sinusoidal hepática, conduzindo à destruição endotelial e hemorragia peri-portal. Outra explicação é baseada no abrupto e excessivo estímulo regenerativo provocado pelo aumento da pressão venosa portal que, em particular nas primeiras horas, leva a uma proliferação

hepatocitária aumentada, não suportada por uma estrutura sinusoidal organizada que assegure a adequada irrigação sanguínea aos hepatócitos recém-formados, acarretando compromisso funcional hepático. [26–30] Além destes factores, a pressão venosa portal excessiva, provocada pela hepatectomia, induz uma resposta arterial compensadora – “*hepatic buffer response*” – que culmina na redução do fluxo arterial hepático, promovendo lesão isquémica e colangite. [31] O aumento do fluxo venoso portal leva a uma diminuição da concentração de adenosina no *espaço de Mall*, traduzindo-se numa vasoconstrição arterial e consequente diminuição do fluxo arterial responsável pelas lesões parenquimatosas [29].

Com o incremento na prática clínica do transplante de dador vivo, a “síndrome small-for-size” (SSFS) emergiu como um problema clínico importante. A identificação dos factores implicados nesta síndrome, designadamente o status hemodinâmico portal, a idade do dador, o status do receptor e a presença de esteatose no enxerto, tem levado a uma redução na sua incidência [32]. Actualmente, sabe-se que a relação entre o volume do enxerto e o volume hepático do receptor relaciona-se com o aparecimento desta síndrome. Com efeito, a razão volume do enxerto/volume hepático do receptor $< 0,6$ está associada a uma sobrevida aos 90 dias inferior a 54% [20,33]. A explicação patogénica que tem sido proposta para o desenvolvimento desta síndrome é similar à da falência hepática após hepatectomia major, na qual um desproporcional aumento do fluxo sanguíneo e da pressão venosa portais conduziriam a uma lesão parenquimatosa, comprometendo a regeneração hepática [6,34].

A similaridade destas síndromes é de tal modo evidente que *Asencio et al.* propuseram o conceito de “small-for-flow”, baseado na premissa de que a “insuficiência hepática pós-hepatectomia major” e a “síndrome small-for-size” teriam origem nos mesmos factores, relacionados com excessivos fluxo e pressão venosa portal para o parênquima hepático residual, gerando precocemente uma hiperpressão sinusoidal, desnudamento capilar e hemorragia, comprometendo a regeneração hepática [20]. Muitos trabalhos têm suportado esta teoria [35]. Hemorragia peri-sinusoidal e peri-portal são constantemente observadas em biópsias hepáticas nos primeiros dias após hepatectomia major, enquanto a vasoconstrição arterial e a colangite isquémica são observados em estádios tardios [6]. Estudos clínicos envolvendo transplantação hepática, nos quais os fluxos sanguíneos portais e arteriais hepáticos foram medidos intra-operatoriamente, conseguiram reunir explicações adicionais para a etiopatogenia da *small-for-size* e estabeleceram um limite de 300 ml/min/100g de fluxo venoso portal, acima do qual a incidência desta síndrome

aumenta drasticamente [36]. A explicação fisiopatológica foi obtida em estudos experimentais, onde ficou demonstrado que o aumento do fluxo venoso portal estimula a regeneração hepática e constitui um factor patogénico da lesão sinusoidal [37]. O fluxo venoso portal foi inclusivamente considerado o principal factor da disfunção precoce do enxerto, independentemente do tamanho do enxerto, num estudo retrospectivo de 134 doentes submetidos a transplante de dador vivo [6,38].

6.3 A importância da pressão e fluxo venoso portal na génese da “síndrome small-for-size” e da “falência hepática pós-hepatectomia”

Diversos factores implicados na falência hepática pós-hepatectomia têm sido identificados. No entanto, a presença de doença hepática parenquimatosa prévia e a qualidade do futuro remanescente hepático (em termos de função, volume, *inflow* e *outflow*) têm sido relacionados de forma mais estreita com a FHPH. Alguns estudos têm demonstrado a importância da pressão venosa portal no desenvolvimento de insuficiência hepática após hepatectomia major ou transplante hepático de dador vivo, quer em doentes com lesão hepática prévia, quer em fígados cirróticos, relevando a importância da avaliação precoce da pressão venosa portal como factor preditor independente para o desenvolvimento de insuficiência hepática após hepatectomia major. [39]

A relação entre a hiperperfusão portal e a síndrome small-for-size, com compromisso da regeneração, tem sido bem estabelecido em pacientes cirróticos submetidos a transplante [6,36,37,40,41]. *Yagi et al.* mostraram que uma pressão venosa portal superior a 20 mm Hg está associada com o desenvolvimento de ascite, coagulopatia e hiperbilirrubinemia acompanhadas de hipertrofia precoce do enxerto, elevação de níveis de factor de crescimento hepatocitário e diminuição de níveis de factor de crescimento epitelial, sugerindo que a pressão venosa portal também influencia a regeneração hepatocitária [42]. Confirmando esta conclusão, num estudo experimental em modelo suíno, *Fondevila et al.* demonstraram que a síndrome *small-for-size* está associada a um aumento do fluxo venoso portal e a uma diminuição do fluxo arterial hepático, incrementando a lesão endotelial sinusoidal logo após a reperfusão do enxerto, com subsequente elevação sérica dos marcadores de citólise hepática. Demonstraram também que a hiperperfusão portal constitui um estímulo à regeneração, mas causa simultaneamente lesão endotelial irreversível [29]. Em consonância com estas conclusões,

o fluxo venoso portal foi inclusivamente considerado o principal factor preditor da disfunção precoce do enxerto, independentemente do tamanho do enxerto, num estudo retrospectivo de 134 doentes submetidos a transplante hepático de dador vivo [6,38]. *Kaido et al.* mostraram que o *cut-off* da relação volumétrica enxerto/receptor em transplante hepático de dador vivo pode ser reduzido para 0,6 se combinado com o controlo da pressão venosa portal, permitindo expandir o número de candidatos a esta modalidade terapêutica, assim como melhorar a segurança para o dador ao usar o seu lobo esquerdo do fígado como enxerto [43]. *Govil et al.* vão mais longe e, além de recuperar o conceito de *small-for-flow* de *Asencio et al.*, confirmam que a disfunção do enxerto no transplante hepático de dador vivo, apesar de ser multifactorial, está associada a pressão e fluxo elevados, recomendam limites de pressão e fluxo portais protectores desta síndrome e sugerem que ambos devem ser considerados. Apesar da ausência de evidência científica, suportada por uma meta-análise, estes autores sugerem que, no THDV, um fluxo portal 4 vezes maior que o fluxo portal direito do dador (ou seja, maior que 360 ml/min por 100 g de enxerto) ou a combinação de uma pressão venosa portal > 15 mm Hg e um fluxo portal 2 vezes maior que o fluxo portal basal direito do dador (ou seja, > 180 ml/min por 100g de enxerto), aumenta significativamente o risco de ocorrência de *small-for-flow* [44].

Similarmente, em doentes cirróticos, a relação entre a excessiva elevação da pressão portal pré-resssecção hepática e a falência hepática após hepatectomia, tem sido bem evidenciada, considerando-a um factor decisivo para a ocorrência desta síndrome no pós-operatório. *Hernandez-GEA et al.* publicaram uma revisão dos trabalhos que confirmaram o impacto da pressão venosa portal no risco de falência hepática pós-hepatectomia e na mortalidade. Concluíram que a sobrevida aos 3 anos era em média de 59% nos doentes com sinais clínicos de hiperpressão portal, em contraste com 72% de sobrevida média aos 3 anos nos doentes sem qualquer sinal clínico desta síndrome. Uma diferença similar foi observada em estudos coorte japoneses, ao analisarem a descompensação pós-hepatectomia e a sobrevida aos 5 anos de doentes submetidos a ressecção hepática por hepatocarcinoma [5]. Um estudo pioneiro de *Bruix et al.* mostrou uma série de 29 doentes cirróticos CHILD-PUGH A, com hepatocarcinoma menor que 5 cm, submetidos a hepatectomia, cujo gradiente de pressão venosa hepática (diferencial entre a pressão venosa portal e a pressão da veia cava inferior) ≥ 10 mm Hg constituía um factor independente para o desenvolvimento de descompensação nos 3 meses após hepatectomia [45]. Trabalhos de investigação mais recentes confirmaram, de forma retrospectiva ou prospectiva, que a presença de hipertensão portal clinicamente significativa, definida como um gradiente de pressão venosa hepática ≥ 10 mm Hg,

eventualmente aferida pela presença de marcadores clínicos (detecção endoscópica de varizes esofágicas ou esplenomegalia superior a 12 cm associada a contagem de plaquetas inferior a 100.000/mm³), pode influenciar negativamente o período pós-operatório dos doentes CHILD-PUGH A submetidos a ressecção hepática [40,46]. *Berzigotti et al.* vão mais longe e, para além de validar o impacto negativo da hiperpressão venosa portal clinicamente significativa na recuperação dos doentes submetidos a ressecção hepática por hepatocarcinoma, preconizam que a evidência de hiperpressão portal deve levar a uma investigação suplementar que inclui a determinação do gradiente de pressão venoso hepático. Concluíram também que o único marcador clínico de hiperpressão portal que pode evitar esta manobra invasiva seria a existência de varizes esofágicas, dado que o seu aparecimento pressupõe um gradiente de pressão venoso hepático superior a 10 mm Hg. [41] Confirmado o impacto clínico da hiperpressão venosa portal prévia à hepatectomia, nos doentes cirróticos, outros trabalhos permitiram estratificar o risco mediante a graduação da pressão venosa portal. *Chen et al.* mostraram no seu estudo clínico prospectivo, englobando uma série de doentes submetidos a hepatectomia por hepatocarcinoma e medição intra-operatória da pressão venosa portal, que a severidade da hiperpressão portal clinicamente significativa, graduada por diferentes níveis, pode ser útil para estratificar o risco de doentes cirróticos CHILD-PUGH A e predizer a ocorrência de falência hepática após hepatectomia. De facto, o estudo demonstrou que a pressão venosa portal aumenta com o grau de fibrose hepática e com a severidade dos sinais clínicos de hiperpressão portal. Mais importante, concluiu que a pressão venosa portal é um factor de risco independente para a falência hepática após hepatectomia e o grau destes parâmetros são directamente proporcionais.

Estudos clínicos evidenciaram os efeitos nefastos da elevação da pressão venosa portal (PVP) após hepatectomia e a sua importância como factor preditor de FHPH. *Hidaka et al.* demonstraram, num estudo clínico prospectivo, englobando doentes submetidos a ressecção hepática por hepatocarcinoma e medição da PVP imediatamente após hepatectomia, que uma PVP ≥ 20 cm H₂O (± 15 mm Hg) está associada a uma menor sobrevida livre de doença [47]. *Allard et al.* publicaram mais recentemente um estudo clínico, envolvendo doentes sem cirrose ou fibrose severa, submetidos a hepatectomia major e medição intra-operatória da PVP após ressecção hepática, demonstrando que uma PVP imediatamente após hepatectomia ≥ 21 mm Hg é um preditor importante da FHPH e de mortalidade nos 90 dias pós-operatórios [1]. Uma revisão sistemática recente abordando esta temática, elaborada pelo nosso grupo, não só sugere que os doentes que desenvolvem FHPH, exibem um aumento da PVP após hepatectomia major,

comparativamente aos doentes que não evidenciam esta síndrome, como reforça a importância da medição intra-operatória da PVP [48]. Além disso, esta meta-análise conclui que a alteração da PVP durante a hepatectomia é mais fidedigna a prever um aumento do risco de FHPH, do que uma medição isolada da PVP após hepatectomia [48].

Paralelamente a estes estudos clínicos, outros trabalhos de carácter experimental corroboram a importância da pressão venosa portal na recuperação após hepatectomia major, permitindo explicar a fisiopatologia subjacente à ocorrência de falência hepática após elevação da pressão venosa portal no fígado remanescente. *Tralhão et al.* comprovaram que uma hepatectomia de 85% no modelo murino, ao simular as alterações da perfusão hepática, provocando uma hiperpressão venosa portal para um remanescente hepático muito reduzido, caracteriza-se por uma disfunção hepática severa ou mesmo falência hepática na primeira semana pós-operatória, reflectindo uma alta taxa de mortalidade nos ratos submetidos a hepatectomia de 85% [15]. De forma similar, no modelo suíno, *Asencio et al.* demonstraram uma associação entre a hiperperfusão portal gerada após hepatectomia de 85% e a lesão sinusoidal comprovada 5 minutos após ressecção, bem como a esteatose microvesicular, a hemorragia peri-portal e a desnudação das células endoteliais arteriais às 24 horas após ressecção [20]. *Mortensen et al.* progrediram nestas conclusões, ao analisar de que forma a extensão da hepatectomia e a consequente elevação da pressão venosa portal gerada influenciam o perfil de expressão genética no modelo suíno. Detectaram uma expressão aumentada de genes envolvidos na apoptose, no metabolismo do óxido nítrico e no stresse oxidativo no grupo submetido a hepatectomia de 75% e que exibiu uma pressão venosa portal elevada. Em contrapartida, o grupo submetido a hepatectomia de 62%, exibindo uma pressão venosa portal moderada, expressava sobretudo genes implicados no ciclo de regeneração celular [1,49]. Mais recentemente *Leng et al.* demonstraram no modelo suíno que a isquemia hepática intra-operatória, ao causar lesão do endotélio sinusoidal, diminui a capacidade de regular a hiperpressão venosa portal infligida após hepatectomia major, estabelecendo um carácter cíclico neste processo degradativo [50].

Estes estudos clínicos e experimentais demonstraram que um desproporcionado aumento do fluxo venoso portal e da pressão venosa portal, gerado após hepatectomia major, leva a lesão sinusoidal e isquémica, devido à redução compensatória do fluxo arterial hepático, comprometendo a regeneração hepática [1,6]. Concomitantemente, permitiram esclarecer alguns mecanismos através dos quais o aumento da pressão venosa portal induz efeitos deletérios sobre o parênquima hepático, ao incrementar a apoptose e

o stresse oxidativo, mediados pela resposta humoral e inflamatória. Esta evidência pode explicar a necessidade de um maior volume do enxerto hepático em doentes cirróticos, cujo status de circulação híper dinâmica pode acarretar, com maior probabilidade, uma falência hepática após transplante de dador vivo [6,48,51]. Além disso, estes estudos demonstraram que, em situações de lesão hepática como a esteatose, a cirrose, a exposição prolongada a agentes quimioterápicos ou a isquemia intra-operatória prolongada, o limiar de tolerância à hiperpressão portal está diminuído, resultando na necessidade de um maior FRH [6,34].

No entanto, a metodologia usada nestas investigações e, por conseguinte, as conclusões obtidas acrescentam pouco. Um exemplo é a falta de uniformidade na definição dos objectivos. Alguns estudos focam-se no fluxo portal, outros analisam o gradiente de pressão venosa hepática, por considerarem ser mais fidedigno que a medição isolada da pressão venosa portal, desvalorizando a difícil exequibilidade dos procedimentos, tornando pouco viável a sua aplicação clínica. Poucos trabalhos se centram nos efeitos da elevação da pressão venosa portal, induzida pela hepatectomia major ou transplante de dador vivo. Se apenas considerarmos estes últimos, concluímos que a maioria se limita a estabelecer uma relação entre a elevação da pressão venosa portal gerada e os efeitos deletérios no parênquima hepático, bem como o consequente impacto clínico. Apenas alguns trabalhos atribuem um *cut-off* de pressão venosa portal, a partir do qual a falência hepática após hepatectomia ou a “síndrome small-for-size” se tornam muito prováveis. Estas condicionantes ficaram patentes na revisão sistemática recentemente publicada pelo grupo, restringindo a possibilidade de se obterem conclusões com robustez estatística significativa [48]. As limitações desta meta-análise, designadamente o escasso número de estudos clínicos, impossibilitam a realização de uma análise por subgrupos ou meta-regressão. Além disso, o elevado número de factores predisponentes de FHPH, muitos deles ignorados nos estudos publicados e que podem influenciar a relação da PVP e a FHPH, podem promover a ocorrência de viés de confundimento e falsear as conclusões obtidas. Outras limitações patentes são: a reduzida amostra de doentes incluídos na maior parte dos estudos e que pode diminuir a precisão dos resultados; a disparidade de metodologias usadas, nomeadamente a inclusão de doentes com diferentes graus de insuficiência hepática após hepatectomia, a adopção de diferentes *cut-offs* preditores de FHPH; a não inclusão de outros *outcomes* após hepatectomia nos trabalhos publicados, designadamente a morbi-mortalidade. [48]

Standardizar a metodologia, definir o objectivo e determinar o *cut-off* acima do qual podemos prever com fiabilidade a ocorrência de falência hepática após a hepatectomia ou

síndrome *small-for size*, é actualmente não só uma necessidade primordial, como também abre portas à implementação de estratégias moduladoras do influxo portal [1,20,35].

6.4 Modulação do influxo portal como factor protector da falência hepática após hepatectomia

Diversos trabalhos publicados nos últimos anos visam modular o influxo portal e consequentemente proteger o endotélio sinusoidal das lesões que indubitavelmente a elevação da pressão portal gera após ressecção hepática major, quer através da elevação das forças tangenciais contra as paredes sinusoidais hepáticas, quer por via da libertação de endotoxinas intestinais, citocinas e de radicais livres de oxigénio resultantes do stresse oxidativo induzido [29].

Considerando a fisiopatologia da lesão endotelial gerada pela elevação da pressão venosa portal, diversas estratégias têm sido propostas para modular o influxo portal. Desde logo, medidas farmacológicas e técnicas cirúrgicas têm sido testadas, não só isoladamente como em complementaridade. Restringindo a pesquisa à investigação da modulação do influxo portal na ressecção hepática, excluindo o THDV, discriminam-se as diversas medidas farmacológicas (tabela 1) e técnicas cirúrgicas (tabela 2) que têm sido estudadas.

Admitindo que a lesão endotelial sinusoidal tem origem na resposta inflamatória e humoral que culmina na apoptose, tem sido postulado que anti-inflamatórios e antioxidantes, administrados no período per-operatório, poderiam minorar os efeitos nefastos das lesões induzidas pela reperfusão no fígado remanescente ou enxerto de dador vivo [29]. Nesta linha de raciocínio, *Boermeester et al.* comprovaram que a administração de *Bactericidal permeability increasing protein-23* (rBPI₂₃) neutraliza as endotoxinas endógenas e aumenta o fluxo sanguíneo hepático após hepatectomia major, promovendo a proliferação celular peri-portal e peri-central, que parece resultar numa estimulação do fluxo arterial hepático.[52] A importância destes resultados, constituiu um estímulo a posteriores investigações, que viriam a demonstrar a importância da circulação hepática arterial na protecção do parênquima hepático. Apesar dos resultados encorajadores, a utilização clínica destes fármacos não se revelou promissora.

Como pioneiro da investigação nesta temática, *M. Ohtake et al.* estudaram o efeito do ácido ursodesoxicólico, no modelo murino, concluindo que, apesar da instabilidade

hemodinâmica gerada pelo efeito tóxico da sua administração, o que inviabiliza a sua aplicação clínica, este fármaco estimula o aumento do fluxo venoso portal após hepatectomia. [53]

Baseados no conhecimento dos efeitos da administração de dopamina, em doses moderadas, no leito vascular, com consequente diminuição da resistência vascular periférica mesentérica e renal, *Nishimura et al.* observaram que este fármaco contribui para o controlo da resistência ao fluxo portal, gerando um aumento do fluxo venoso portal e redução da PVP [54]. Contudo, este efeito dopaminérgico não perdura ao longo do tempo, em virtude da semi-vida curta, o que torna inútil a sua aplicação clínica.

Sustentados na experiência clínica de que a somatostatina e análogos, ao reduzir transitória e significativamente a pressão venosa portal, auxiliam no controlo da hemorragia aguda por varizes esofágicas [55,56], diversos estudos experimentais, em transplante hepático no modelo animal, têm mostrado resultados promissores, permitindo em alguns deles esclarecer o mecanismo fisiopatológico dos fármacos utilizados [57–59]. *Xu et al.* investigaram o efeito protector da somatostatina na síndrome *small-for-size* em ratos submetidos a transplante ortotópico. Verificou um decréscimo significativo da pressão venosa portal nos primeiros trinta minutos após perfusão do enxerto e um incremento da função hepática, que se reflectiu num aumento significativo da sobrevida ao 7º dia no grupo tratado com somatostatina, relativamente ao grupo de controlo [60]. Numa tentativa de transpor estes resultados para a cirurgia de ressecção hepática, *Mohkam et al.* confirmaram o efeito modulador da somatostatina na hepatectomia major do modelo suíno e, mais recentemente, *A. Hesshmeier et al.* comprovaram que este fármaco diminui a PVP, atenua a lesão hepatocelular e diminui a apoptose e a activação das “*Stem-cells*” hepatocitárias, mitigando a fibrogénese hepática, causada pela elevação da PVP após hepatectomia [37,61]. No entanto, permanece desconhecido o efeito clínico na sobrevida. No modelo murino, foi comprovado que o octreótido, apesar de inibir a regeneração precoce, protege os hepatócitos do stresse oxidativo, reduzindo a inflamação secundária através da regulação do ciclo da metionina, ao aumentar os níveis da 5'-metiltioadenosina, evitando a falência hepática após hepatectomia. Contudo, ficou demonstrado que não diminui a pressão venosa portal [62]. *Ozden et al.* reportaram um caso clínico de *small-for-size* após transplante hepático com laqueação da artéria esplénica associada, cujo tratamento com propranolol e somatostatina foi bem sucedido [63]. Não obstante este caso clínico, a somatostatina e análogos revelaram, em estudos prévios no modelo murino, um

efeito inibidor na regeneração hepática após hepatectomia, o que limita a sua utilização em cirurgia hepática [64].

Diversos trabalhos realizados na década de 1990 permitiram concluir que a prostaglandina E₁ (PGE₁ – vasodilatador usado na prática clínica), independentemente da via de administração, aumenta o fluxo venoso portal, sem efeito na pressão arterial sistémica [65–68], para além de proteger o parênquima hepático da lesão induzida pela isquemia/reperfusão durante a hepatectomia [65–69]. Mais recentemente, vários trabalhos no modelo murino, têm corroborado este efeito protector da PGE₁ sobre o parênquima hepático. *Matsuo et al.* mostraram que a PGE₁ incrementa a indução de proteínas *heat-shock* imediatamente após isquemia/reperfusão de fígado murino, aliviando o stresse oxidativo [70]. *Li et al.* postularam, no seu trabalho experimental no modelo murino, que este mecanismo protector da PGE₁ se devia ao incremento da microcirculação e à redução da pressão venosa portal [71]. Outros trabalhos concluíram que o efeito protector da PGE₁ se deve não só à inibição da apoptose, quer por regulação da caspase 8, quer por promover a expressão de proteínas anti-apoptóticas e promotoras da regeneração, como também se deve à acumulação da proteína *heat-shock* 70 (HSP70), cuja expressão parece proteger a célula do stresse oxidativo [72–75]. Transpondo estas conclusões para a prática clínica, *Suehiro et al.* demonstraram que a infusão portal de PGE₁ em doentes com enxerto small-for-size prevenia a excessiva ascite e hiperbilirrubinemia [76]. Baseado nestes resultados promissores, *Jia et al.* testaram o efeito síncrono da PGE₁ e da somatostatina e observaram uma melhoria da sobrevida em ratos submetidos a hepatectomia de 90%, através da administração prévia destes fármacos [77]. Neste estudo experimental ficou demonstrado que no grupo pré tratado com estes dois fármacos observa-se uma redução da hiperpressão venosa portal induzida pela hepatectomia, uma diminuição dos níveis séricos de enzimas de citólise hepática, uma supressão da produção de citocinas inflamatórias (factor de necrose tumoral alfa (FNT- α) e interleucina (IL) 6, uma inibição da apoptose através da diminuição expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Caspase 3) / incremento de expressão de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) e um efeito protector do stresse oxidativo comprovado pelo aumento de expressão de proteínas *heat-shock* (HSP70 e GRP78) e pela inibição da expressão da proteína homóloga do factor de transcrição C/EBP (CHOP) envolvida na apoptose induzida por stresse oxidativo.

Tendo como premissa o efeito protector de gases endógenos como o óxido nítrico, o monóxido de carbono e o hidrogénio no stresse oxidativo induzido por lesões de

isquemia/reperfusão após transplante [78–81], no modelo murino, foi possível constatar que o óxido nítrico modula a circulação hemodinâmica, promove a protecção tecidual e controla a regeneração, mas não reduz a pressão sobre as paredes sinusoidais e as suas consequências nefastas [82]. *Xiang et al.* demonstram que a inalação de hidrogénio durante a hepatectomia no modelo suíno é exequível e pode proteger o fígado remanescente da hiperpressão portal induzida após hepatectomia, através da redução da inflamação e stresse oxidativo, diminuindo assim a apoptose. Contudo, não ficou comprovado o incremento da regeneração com esta terapêutica farmacológica. Além disso, não se demonstrou por que via molecular este fármaco exerce o seu efeito protector [83].

Numa tentativa de otimizar os efeitos vasodilatadores periféricos dos inibidores da fosfodiasterase, foram testados nos modelos murino e suíno os efeitos da olprinona e do cilostazol. A olprinona, um inibidor selectivo da fosfodiasterase III, usada per-operatoriamente no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva por atenuar as lesões de isquemia/reperfusão, revelou minorar os efeitos deletérios da elevação da pressão venosa portal, por preservar a microestrutura hepática, através da regulação da cascata de síntese do óxido nítrico endotelial, permitindo um incremento na sobrevida. Apesar disso, o seu efeito antagónico dose-dependente torna a sua implementação clínica difícil [84–86]. O cilostazol, ao favorecer a expressão do factor de crescimento vascular endotelial (VEGF), aumenta o fluxo arterial hepático e protege a microcirculação hepática, ao controlar a “*Buffer-response*” [87].

Mais recentemente, alguns estudos no modelo murino, concluíram que a terlipressina pode minorar o *small-for-size*, incrementar a regeneração e melhorar a sobrevida após hepatectomia major [88–90]. Este análogo sintético da vasopressina, ao reduzir o fluxo e a pressão venosa portal numa fase precoce após hepatectomia, no modelo murino, exerce um efeito protector sinusoidal e parece minorar o stresse oxidativo [91]. Mais recentemente, além de ter sido confirmado o efeito modulador da PVP, no modelo suíno, verificou-se que a terlipressina modera a regeneração hepática após hepatectomia, o que se reflecte na diminuição da lesão hepática e no consequente aumento da sobrevida [92]. No entanto, os seus efeitos não foram testados clinicamente. Com o intuito de diminuir a dose e minimizar os efeitos laterais dose-dependentes, foi testada a administração concomitante com o octreótido (por via intra-muscular), concluindo que, no modelo suíno, esta terapêutica modula a PVP após hepatectomia major e atenua a lesão tecidual hepática, encetando caminho para a eventual utilização destes fármacos na prática clínica [90]

Tabela 1 – Estudos farmacológicos experimentais de modulação do influxo portal

ESTUDOS FARMACOLÓGICOS				
MODULAÇÃO DO INFLUXO PORTAL APÓS HEPATECTOMIA MAJOR				
MODELO ANIMAL				
Fármaco	Ano	Autor	Modelo	Conclusões
rBRI23	1999	Boermeester	Murino	Neutraliza as endotoxinas endógenas, aumenta o fluxo sanguíneo hepático após hepatectomia e promove a proliferação celular peri-portal e peri-central que parece resultar num ↑ do fluxo arterial hepático.
Ácido ursodesoxicólico	1996	M. Ohtake	Murino	↑ Fluxo venoso portal após hepatectomia, apesar da instabilidade hemodinâmica gerada pelo efeito tóxico da sua administração portal.
Dopamina	1997	A. Nishimura	Murino	Contribui para o controlo da resistência ao fluxo portal, provocando ↑ do fluxo venoso portal e uma redução da PVP.
PGE 1 (via epiplóica) (Via epiplóica / femoral I.V.)	1992	T. Tsukada	Canino	↑ Fluxo venoso portal
	1993	T. Nakadaira	Murino	↑ Fluxo venoso portal
	1995	D. Ishiduka	Murino	↑ Fluxo venoso portal após hepatectomia, sem efeito na pressão arterial sistémica.
	1997	T. Aono	Murino	↑ Fluxo venoso portal, sem efeito na pressão arterial sistémica. Melhor absorção pela via epiplóica.
	1998	M.A. Hossain	Murino	Efeito protector no parênquima hepático, da lesão induzida pela isquemia/reperfusão durante hepatectomia, através do ↑ do fluxo sanguíneo hepático.
Somatostatina (via I.V. sistémica) (via portal)	2016	Mohkam	Suíno	Confirmou o efeito modulador da somatostatina na pressão venosa portal, diminuindo a PVP e o fluxo venoso portal.
	2021	A. Hessheimer	Suíno	↓ PVP e melhora a lesão hepatocelular, ↓ a apoptose, ↓ a activação das <i>stem-cells</i> hepatocitárias e a fibrogénese precoce.
PGE1+ somatostatina	2013	Jia	Murino	Induz melhoria da sobrevivência, devido ao ↓ da PVP, supressão de citocinas inflamatórias, inibição da apoptose e efeito protector no stresse oxidativo.
Óxido nítrico	2008	D. Cantré	Murino	Modula a circulação macro hemodinâmica, promove a protecção tecidual e controla a regeneração, mas não reduz a perfusão intra-hepática, nem a consequente pressão sobre as paredes sinusoidais.
Inalação de hidrogénio	2012	Xiang	Suíno	Redução da resposta inflamatória, do stresse oxidativo, da apoptose e da necrose, sem promover a regeneração.

Olprinona	2011	Yamanaka K	Murino	Redução dos efeitos deletérios da elevação da pressão venosa portal, protegendo as células sinusoidais endoteliais e ↓ a apoptose hepatocitária, através da regulação da síntese endotelial de óxido nítrico.
	2014	K. Iguchi	Suíno	Atenua o ↑ da PVP na fase aguda após hepatectomia e preserva a microestrutura hepática, condicionando um ↑ da sobrevivência ao 7º dia P.O.
Cilostazol	2015	M. Von Heesen	Murino	↑ fluxo arterial intra-hepático, favorece a expressão de VEGF, promovendo a protecção da microcirculação e do parênquima hepáticos.
Octreótido	2016	Du Z.	Murino	Inibe precocemente a regeneração. Protege os hepatócitos do stresse oxidativo através da regulação do ciclo da metionina. Não diminui a PVP.
Terlipressina (Via femoral/VCI)	2014	Fahner	Murino	Provoca ↓ PVP, promove a regeneração celular, a manutenção da microestrutura hepática e a redução da resposta ao stresse oxidativo, condicionando uma melhor sobrevivência.
(Via I.M.)	2021	Hye-Sung Jo	Suíno	↓ PVP, modera a regeneração hepática, resultando na protecção da lesão hepática e no ↑ da sobrevivência.
Terlipressina + octreótido (Via I.M.)	2019	Hye-Sung Jo	Suíno	↓ da PVP e atenua a lesão tecidual hepática.

PGE1: prostaglandina E1. HSP70: proteína heat-shock 70. PVP: pressão venosa portal. VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Noutra linha de estratégia para modular o influxo portal, diversas técnicas cirúrgicas têm sido postuladas, apesar da actual ausência de critérios para a sua execução [93]. Estas técnicas moduladoras do influxo portal são resumidas na tabela 2.

A plasmaferese e outras manobras de purificação plasmática têm sido usadas para tratar a falência hepática após hepatectomia e a síndrome *small-for-size*, com o intuito de diminuir o nível de toxinas séricas [94–96]. Contudo, nenhuma destas estratégias resultaram num significativo incremento da sobrevivência, possivelmente porque não actuam no mecanismo patogénico responsável pela falência hepática – a elevação da pressão venosa portal. Associando duas técnicas, purificação plasmática e modulação portal, Peng *Hou et al.* observaram, no modelo suíno, que a derivação portal contínua extracorporeal associada à plasmaferese não só diminuía o nível de toxinas séricas, como também aliviava

a hiperpressão portal induzida pela hepatectomia de 85% a 90%, permitindo, além de uma atenuação da lesão sinusoidal endotelial e hepatocitária, um significativo decréscimo dos níveis séricos de endotoxinas / DNA bacteriano, de IL-6 e do FNT- α [27].

Uma outra estratégia testada com resultados promissores, embora com iatrogenia significativa, é a jejunectomia com preservação de 10 cm proximais ao ângulo de Treitz, que revelou ser eficaz na modulação da PVP, minimizando a disfunção do remanescente hepático. [97]

Diversos tipos de *shunt* porto-sistêmicos têm sido testados no modelo animal, com o intuito de modular a PVP após hepatectomia major, sem comprometer a regeneração ou agravar a disfunção hepáticas. Uma das primeiras técnicas investigadas foi a execução de um *shunt* venoso, através de um *bypass* espleno-femoral sob tubo de *Anthron*[®], que no modelo canino permitiu modular a PVP e controlar os danos induzidos sobre a rede sinusoidal hepática, após Hx de 84% [98]. Mais recentemente, no modelo murino, foi efectuada com sucesso a transposição subcutânea do baço na parede torácica, permitindo assim, modular a PVP e, conseqüentemente, reduzir a síntese do óxido nítrico, responsável pelos efeitos deletérios sobre o parênquima hepático, o que possibilitou um aumento significativo da sobrevida após Hx de 90% [99,100].

Como pioneiro do *shunt* porto-cava, foi testada a transposição porto-cava, verificando-se que esta melhorava a perfusão hepática após Hx [101].

Uma das manobras cirúrgicas mais estudadas é a execução de um *shunt* porto-cava latero-lateral, antes da hepatectomia, cujos resultados têm sido promissores, pois esta manobra diminui a pressão venosa portal após hepatectomia sem comprometer a regeneração hepática [1]. Diversos estudos mostram, no modelo animal, que o *shunt* porto-cava realizado antes de hepatectomia major protege o parênquima hepático das lesões induzidas pela hiperpressão portal, diminui a apoptose e incrementa a regeneração celular, permitindo evidenciar uma redução na mortalidade pós-operatória [30,102–105]. De forma similar, Tu *et al.* demonstraram, no modelo suíno, que um *shunt* meso-cava associado a hepatectomia major que garanta um fluxo portal de 3,2 vezes o valor basal (pré-hepatectomia) alivia a lesão induzida pela hiperpressão portal e diminui a translocação bacteriana / libertação sérica de endotoxinas, promovendo um papel importante na regeneração hepática do fígado remanescente. Além disso, comprovou ser seguro, no modelo animal, realizar hepatectomias com um FRH no limite da exequibilidade se

associarmos um shunt porto-cava [106]. Recentemente foram publicadas series de doentes submetidos a transplante hepático de dador vivo, utilizando o lobo esquerdo como enxerto, associado a shunt porto-cava para prevenir a síndrome *small-for-size* [107]. Infelizmente a taxa de complicações não é desprezável e a excessiva diversão do fluxo portal, que condiciona encefalopatia e comprometimento da regeneração hepática, tem levado a uma necessidade de re-intervenção pouco satisfatória [93,108,109].

Outras manobras de derivação portal têm sido testadas, para obviar estas limitações, particularmente o excessivo *shunting*.

Marubashi et al. comprovaram a exequibilidade da anastomose porto-hepática entre ramos secundários com menor iatrogenia (reconhecendo que a elevação da PVP é um estímulo necessário para a regeneração hepática após Hx major, através da activação do factor de crescimento hepatocitário), embora o *follow-up* curto (24 horas) seja insuficiente para se obter conclusões acerca da regeneração, apoptose ou síntese de DNA [110]. Tal estímulo regenerativo foi corroborado pela tentativa infrutífera de obviar o excessivo *shunting* porto-cava, através da arteriolização da veia Porta, a qual revelou comprometer a regeneração e função hepáticas, 6 semanas após Hx de 70% [111].

Wang et al. testaram a derivação portal contínua extracorporal temporária, como substituto dos *shunts* porto-cava, na síndrome *small-for-size*, no modelo suíno, concluindo que, com menor iatrogenia é possível modular de forma dinâmica o influxo portal, reduzindo as lesões parenquimatosas hepáticas e incrementando a regeneração [112]. Num estudo clínico de três casos foi demonstrada a exequibilidade e eficácia de uma anastomose porto-umbilical durante o transplante hepático, permitindo um débito de 1,2 a 1,7 l/min no shunt [113]. *Dognul et al.* reportaram um caso clínico bem-sucedido de redução da pressão venosa portal em 20%, durante um transplante hepático de dador vivo, através da preservação da veia umbilical patente e suas colaterais [114]. Contudo, tal como as outras técnicas de *shunt*, a sua aplicação clínica permanece controversa [108].

Mais recentemente, numa tentativa de diminuir a iatrogenia, mantendo o objectivo de modular o influxo portal de forma dinâmica e temporária, foram testadas no modelo animal técnicas como a embolização portal por canulação da veia jejunal [115] e a aplicação percutânea de anel redutor ajustável do calibre da veia Porta [116,117]. Tais manobras cirúrgicas revelaram-se promissoras no controlo dos efeitos deletérios do

parênquima hepático causado pela elevação da PVP após Hx, minimizando a disfunção hepática nos pós-operatório.

Apesar dos resultados promissores destas estratégias moduladoras de influxo portal, numa vertente farmacológica ou através da implementação de técnicas cirúrgicas, não se verificou um incremento significativo na sobrevida. De facto, muitas destas estratégias revelaram um efeito inibitório sobre a regeneração hepática, o que limita a sua utilização em cirurgia hepática [64]. Por outro lado, demonstraram, em modelos animais, uma elevada taxa de morbilidade e mortalidade ou simplesmente não se revelaram actuar sobre o mecanismo fisiopatológico responsável pela falência hepática após hepatectomia ou síndrome *small-for-size* – a elevação da pressão venosa portal após hepatectomia major [27].

Assumindo que o fluxo sanguíneo esplénico contribui em 52% para o influxo portal, o seu papel na elevação da pressão venosa portal após hepatectomia major é evidente. Na tentativa de ultrapassar as limitações das estratégias anteriormente descritas, têm sido investigados os efeitos de uma esplenectomia após hepatectomia major. No modelo animal, a esplenectomia associada a hepatectomia, ao diminuir o fluxo venoso portal, protege o parênquima hepático, ao incrementar o fluxo arterial hepático, com a consequente melhoria da oxigenação tecidual, promove a regeneração celular e parece incrementar a função hepática pós-operatória e a sobrevida [118–123]. Mais recentemente *Ulmer et al.* concluíram que a esplenectomia se revelou incapaz de promover a modulação do influxo portal [124]. Apesar das conclusões contraditórias dos estudos experimentais, foram desenvolvidos ensaios clínicos, nos quais se demonstrou que a modulação do influxo portal é eficaz em doentes submetidos a transplante hepático de dador vivo, com enxertos de lobo esquerdo, mantendo a pressão venosa portal, após reperfusão, em valores inferiores a 15 mm Hg, através de esplenectomia associada a laqueação de shunts porto-sistémicos [43]. Contudo, o *follow-up* curto não permite aferir os efeitos imunológicos da esplenectomia a longo prazo. Para além disso, a elevada taxa de complicações sépticas torna esta estratégia controversa [125–127].

De modo a induzir uma iatrogenia menor e minorar a taxa de complicações da esplenectomia, também tem sido testada a embolização ou LAE como manobra moduladora do influxo portal [128,129]. Não obstante os resultados encorajadores, muitos destes trabalhos têm-se confinado a *case reports* ou a estudos coorte com amostras

reduzidas. Com o intuito de explicar a fisiopatologia que suporta estas conclusões, *Ito et al.* e *Irie et al.* estudaram os efeitos da laqueação da artéria esplénica em ratos submetidos a hepatectomia major [130,131]. Todavia, para além da laqueação da artéria esplénica, ambos os estudos efectuados incluíam um procedimento que induz lesão de isquemia / reperfusão hepática, o que constitui um viés. Além disso, o primeiro estudo restringe-se a avaliar os efeitos desta manobra no parênquima hepático, na regeneração celular e na sobrevida, enquanto o segundo testa especificamente o efeito protector desta estratégia através da indução da expressão da heme-oxigenase-1 (HO-1). Posteriormente, foi postulado que a LAE não tem qualquer efeito sobre a PVP, ou sobre a hemodinâmica arterial hepática após Hx de 70% ou 90% [132]. Apesar da contradição dos estudos experimentais no modelo animal, na tentativa de testar a manobra no modelo humano, *Duan et al.* demonstraram um melhor controlo da elevação da pressão portal gerada após ressecção hepática por hepatocarcinoma, nos doentes cirróticos CHILD-PUGH B, se associada a esplenectomia *in situ*, apesar de não diminuir a taxa de complicações pós-operatórias. Além disso, não corroborou a eficácia da laqueação da artéria esplénica, comprovada em alguns modelos experimentais prévios, como moduladora do influxo portal após hepatectomia major [133]. A ausência de grupo de controlo neste estudo diminui a força das suas conclusões.

Tabela 2 – Estudos experimentais: estratégias cirúrgicas de modulação do influxo portal associadas a hepatectomia major ou a transplante hepático

Estratégias cirúrgicas de modulação do influxo portal				
Estudos experimentais e/ou ensaios clínicos				
Procedimento cirúrgico	Ano	Autor	Modelo	Conclusão
Diversão portal extra-corpórea	2015	Da-Dong Wang	Suíno	Modula de forma dinâmica a PVP, minimiza o efeito deletério sobre o parênquima hepático e promove a regeneração hepática. Alternativa ao shunt porto-cava definitivo
Diversão portal extra-corpórea + plasmaferese	2013	P. Hou	Suíno	Alivia o efeito tóxico e atenua a lesão induzida pela hiperperfusão portal
Jejunectomia com preservação de 10 cm proximais ao ângulo de Treitz	2005	Y. Kawano	Canino	Modula a PVP e minimiza a disfunção do remanescente hepático
Shunt venoso espleno-femoral	1995	S. Ueno	Canino	Modula a PVP e melhora os danos na rede sinusoidal hepática após Hx 80%
Shunt meso-cava (via veia renal esquerda)	2014	X-Q Wang	Suíno	Reduz o efeito deletério da hiperperfusão portal após Hx. PVP >3,2xs o valor de PVP basal promove a regeneração hepatocitária e reduz a apoptose
Shunt meso-cava (termino-lateral)	2013	Y-L Tu	Suíno	Descomprime a circulação venosa portal e atenua a lesão produzida pela hiperperfusão portal
Shunt porto-sistêmico: Transposição subcutânea do baço na parede torácica	2000	T. Fukuchi	Murino	Minimiza os danos sobre o parênquima hepático e aumenta a sobrevida após Hx 90%
	2009	H. Hayashi	Murino	Diminui a PVP após Hx 90%, e a consequente síntese de óxido nítrico responsável pelos efeitos deletérios no parênquima hepático
Transposição porto-cava	1978	C. J. Ryan	Murino	Melhora a perfusão hepática após Hx
Shunt porto-cava latero-lateral	1997	Y. Sato	Murino	Modula a PVP após Hx 70%
	1999	Y. Mitsumoto	Canino	Associado a administração do imunossupressor Fk 506 (Tacrolimus) incrementa a sobrevida após Hx 80%
	2006	H. Wang	Suíno	Modula a PVP, protege o sistema retículo-sinusoidal hepático e incrementa a sobrevida, após Hx 80%
	2007	T. Lida	Suíno	Diminui os estímulos para a regeneração hepática, após Hx major, protegendo o parênquima hepático.
	2018	J. Hammond	Suíno	Modula a PVP após Hx 80%. A instabilidade hemodinâmica desenvolvida após o shunt, limita a comparação com a administração de terlipressina.
Shunt porto-cava termino-lateral + arterialização da veia porta	2008	K. Schleimer	Murino	Diminui a regeneração hepática, incrementa a apoptose e compromete a hipertrofia e função hepáticas 6 semanas após Hx 70%. A arteriolização da veia porta não se recomenda como manobra definitiva.
Shunt venoso porto-hepático	2004	S. Marubachi	Murino	A elevação da PVP após Hx major é um estímulo necessário para a

				regeneração hepática, através da activação do factor de crescimento hepatocitário.
Embolização portal por canulação da veia jejunal	2016	J. M. Asencio	Suíno	Embolização portal 24h antes da Hx 90% modula a PVP, atenua os efeitos deletérios sobre o parênquima e melhora a função hepática no pós-operatório.
Aplicação percutânea de anel redutor de calibre da veia porta ajustável	2017	P. Bucur	Suíno	Protege o parênquima hepático do efeito deletério da hiperperfusão portal, minimizando a disfunção hepática durante o processo de regeneração
Redução do calibre venoso portal + laqueação da artéria esplénica	2018	Wang-Xun-Jin	Murino	Diminui o fluxo venoso portal e aumenta o fluxo arterial hepático, permitindo minimizar a disfunção e promover a regeneração após Hx em fígados cirróticos
Esplenectomia	2005	M. Glanemann	Murino	Modula a PVP, diminuindo as lesões parenquimatosas hepáticas, resultando numa melhor sobrevida
	2010	C. Eipel	Murino	Incremento do fluxo arterial hepático, com consequente melhoria da oxigenação tecidual, minimizando os danos sobre o parênquima hepático
	2011	M.M. Nasr	Murino	Incrementa a regeneração hepática
	2016	A. Athanasiou	Suíno	Previne a falência hepática após Hx major
Esplenectomia versus Terlipressina	2017	T.F. Ulmer	Murino	Ambos se revelaram incapazes de reduzir significativamente a PVP ou de estimular a regeneração
Esplenectomia versus 5-Mononitrato de isosorbido	2017	J. Arlt	Murino	5-Mononitrato de isosorbido promove a redução imediata do fluxo e pressão portais, mas não perdura, enquanto a esplenectomia tem um efeito mais duradouro
Laqueação da artéria esplénica	2007	K. Ito	Murino	Reduz a PVP, melhora a citólise e função hepáticas no remanescente hepático sujeito a isquemia / reperfusão durante a hepatectomia
	2012	W-Z Chen	Murino	Reduz a PVP, atenua a lesão tecidual hepática, reduz a translocação bacteriana, diminui a endotoxemia, sem comprometer a imunidade
	2015	B. Darnis	Suíno	Sem efeito sobre a PVP ou a hemodinâmica arterial hepática após Hx 70% ou 90%
	2016	Carrapita	Murino	Permite a modulação da PVP, promove a viabilidade hepatocelular e a regeneração hepatocitária, sem comprometer a função, provavelmente por diminuir o stresse oxidativo

PVP: Pressão venosa portal. Hx: hepatectomia. LAE: laqueação da artéria esplénica

6.5 Objectivo e interesse científico

É hoje inquestionável a importância da PVP como factor preponderante para o *outcome* dos doentes submetidos a hepatectomia major ou THDV. Precisar qual o *cut-off* a partir do qual se poderá antever uma falência hepática pós-hepatectomia ou uma síndrome *small-for-size* será de primordial importância, não só porque irá permitir seleccionar com maior precisão e segurança quais os doentes que poderão suportar uma hepatectomia no limiar da exequibilidade, como também abre portas à implementação de estratégias de modulação do influxo portal. De facto, a modulação do influxo portal poderá condicionar no futuro a cirurgia de ressecção ou transplante hepático. Desde logo, poderá permitir incluir doentes cuja disfunção e lesões hepáticas, condicionadas pela sua patologia de base ou pela terapêutica neo-adjuvante, as excluem actualmente de uma ressecção hepática major. Para além disso, poderá permitir utilizar enxertos hepáticos mais pequenos, sem risco acrescido de ocorrer a síndrome *small-for-size*, o que acarreta menor iatrogenia para o dador e possibilita aumentar o pool de dadores compatíveis. Por último, poderá aumentar a taxa de ressecabilidade na doença metastática, ao permitir reduzir o FRH necessário para obviar a ocorrência de uma falência hepática após hepatectomia.

Porém, o *estado da arte* nesta temática suscita algumas questões: Qual é o *cut-off* de pressão venosa portal, gerado após hepatectomia major ou transplante hepático de dador vivo, a partir do qual é aceitável executar um procedimento de modulação de influxo portal? Que factores influenciam este *cut-off*? A pressão venosa portal basal pré-hepatectomia e a qualidade do parênquima hepático têm sido considerados? É aceitável realizar procedimentos cirúrgicos com elevada morbimortalidade com o intuito de modular o influxo portal? Qual a eficácia das estratégias moduladoras do influxo portal consideradas mais seguras e menos iatrogénicas? Qual o seu impacto na regeneração, função e viabilidade hepatocitárias?

Com o intuito de tentar responder a estas questões, planeou-se realizar esta investigação em duas vertentes, clínica e experimental.

Na perspectiva clínica, pretende-se avaliar o impacto da alteração da pressão venosa portal após hepatectomia na citólise e função hepáticas e na morbimortalidade, considerando de forma mais ampla os factores envolvidos, nomeadamente a pressão

venosa portal basal pré-hepatectomia e o grau de deterioração do parênquima hepático, causado por doença ou tratamentos concomitantes. De notar que os escassos estudos prévios não consideram de forma tão vasta os factores envolvidos, nomeadamente o incremento da pressão venosa portal durante a hepatectomia.

Na vertente experimental, intenta-se conhecer, de forma abrangente, os efeitos de uma manobra moduladora do influxo portal tecnicamente exequível e menos iatrogénica do que as outras estratégias já testadas. Para tal, propõe-se avaliar, em modelo murino, o impacto da laqueação da artéria esplénica associada à hepatectomia major, na função, regeneração e viabilidade hepatocelulares.

7. Impacto da alteração da pressão venosa portal após hepatectomia major na citólise, função hepática e morbimortalidade

7.1 Introdução e objectivo

A importância da PVP na génese da insuficiência hepática, após hepatectomia major ou transplante hepático de dador vivo, tem estado patente em diversos trabalhos experimentais e clínicos, focando a importância da avaliação precoce da pressão venosa portal como factor preditor independente para o desenvolvimento da falência hepática após hepatectomia major [1,15,20,26,41,50,134].

Prever a ocorrência da síndrome *small-for-size* e da falência hepática pós-operatória no transplante hepático de dador vivo ou na hepatectomia major, através da monitorização intra-operatória da pressão venosa portal, constitui não só uma necessidade já estabelecida, como também abre portas para a implementação de estratégias moduladoras de influxo portal [135]. No entanto, poucos trabalhos publicados atribuem um *cut-off* de PVP, acima do qual a falência hepática após hepatectomia ou a síndrome *small-for-size* se tornam muito prováveis. Além disso, não consideram outros factores que influenciam a PVP intra-operatória, designadamente o valor basal de PVP prévio à hepatectomia. Neste contexto, propõe-se avaliar o impacto da alteração da PVP durante a hepatectomia na citólise, função hepática e morbimortalidade.

7.2 Material e métodos

7.2.1 Definição da alteração de pressão venosa portal

A alteração da PVP foi definida como a diferença aritmética entre os valores obtidos após hepatectomia e antes do procedimento.

7.2.2 Critérios de inclusão e autorização da comissão de ética

Foram incluídos doentes propostos para cirurgia de ressecção hepática no Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia / Espinho, sem cirrose hepática, com FRH >30% [FRH = volume hepático remanescente/ volume hepático funcional (volume hepático total excluindo o volume tumoral)], sem contra-indicação anestésica, por patologia benigna ou maligna.

Todos os doentes incluídos no estudo autorizaram a participação, através de consentimento informado aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia / Espinho, que também aprovou o protocolo deste estudo. (**ANEXO VII**)

7.2.3 Caracterização da amostra

A amostra inclui 30 doentes submetidos a cirurgia de ressecção hepática, por patologia benigna (n=7) ou maligna (n=23), escolhidos aleatoriamente desde Janeiro de 2011 a Abril de 2016. A média das idade = $62,5 \pm 11,4$ anos, com ligeira predominância de género feminino (F=18; M=12). A maioria apresenta diagnóstico de doença hepática metastática e ASA Score (American Society of Anesthesiologists – **ANEXO VIII**) = 2. Nenhum doente apresenta cirrose hepática, hepatite C, hemocromatose ou exposição prévia a hepatotóxicos.

O futuro remanescente hepático, definido pela percentagem de remanescente hepático funcional após hepatectomia, foi estimado por volumetria em tomografia computadorizada efectuada nos 15 dias que antecederam a cirurgia, através de análise de imagens obtidas por tomografia axial computadorizada ou ressonância magnética, por método de delineação manual suportado por software processador de imagens (Osirix®, Pixmeo®, Geneve, Switzerland), de acordo com previamente descrito [136]. Para o efeito, foi determinado o volume hepático remanescente, o volume hepático total e o volume tumoral foram determinados.

Quatro doentes foram submetidos a embolização venosa portal, antecedida de drenagem biliar percutânea trans-hepática do remanescente para garantir reserva hepática suficiente após hepatectomia, de acordo com o descrito previamente [7]. Um doente proposto para hepatectomia direita foi submetido previamente a termoablação por radiofrequência de metástases do futuro remanescente e em 20 doentes foi associada esta técnica à cirurgia de ressecção hepática. A mortalidade observada na amostra (definida como morte nos primeiros 90 dias após hepatectomia) é de 10%, causada por falência hepática (2 casos) e sépsis em contexto de pneumonia (1 caso). As características da amostra estão discriminadas na Tabela 3.

Tabela 3 - características dos doentes incluídos na amostra

Caracterização da amostra	N	Média	%
Idade (anos)	-	62,47±11,42	-
Género, Mas/Fem	12/18	-	40/60
Infeção prévia	7	-	23,33
Diagnóstico			
Benigno ou Pré-maligno	7	-	23,33
- D. Caroli / litíase intra-hepática com atrofia	5	-	16,67
- Adenoma	1	-	3,33
- D. policística hepática sintomática	1	-	3,33
Maligno	23	-	76,67
- Metástases de neoplasia colo-rectal	15	-	50
- Metástases de tumor neuro-endócrino	2	-	6,67
- Metástases de tumor do estroma gastro-intes	1	-	3,33
- Metástase de neoplasia da mama	1	-	3,33
- Hepatocarcinoma	2	-	6,67
- Tumor de Klatskin	1	-	3,33
Hepatite B	1	-	3,33
Hábitos alcoólicos	2	-	6,67
Tabagismo	6	-	20
Diabetes Mellitus	7	-	23,33
Índice de massa corporal	-	26,78±4,48	-
Karnofsky (Status funcional) (ANEXO IX)	-	95,67±7,28	-
ASA (mediana)	-	2	-
FRH	-	0,65 ± 0,18	-
Procedimento cirúrgico			

- Metastasectomias múltiplas /segmentectomia	2	-	6,67
- Bisegmentectomia com/sem metastasectomias / Termoablação	6	-	20
- Trisegmentectomia com/sem metastasectomias / termoablação	3	-	10
- Hepatectomia esquerda	5	-	16,67
- Hepatectomia esquerda + segmentectomia I	2	-	6,67
- Hepatectomia direita com/sem metastasectomias / termoablação	8	-	26,67
- Hepatectomia direita + segmentectomia I	1	-	3,33
- Hepatectomia central com/sem metastasectomias /Termoablação	2	-	6,67
- ALPPS	1	-	3,33
Morbimortalidade			
- sem complicações	7	-	23,33
Clavien Dindo (ANEXO X)			
- Grau I	6	-	20
- Grau II	7	-	23,33
- Grau IIIA	4	-	13,33
- Grau IIIB	2	-	6,67
- Grau IV	1	-	3,33
- Grau V (mortalidade nos primeiros 60 dias)	3	-	10

ASA Score: American Society of Anaesthesiologists physical status. **FRH:** Futuro remanescente hepático. **ALPPS:** Association liver partition and portal vein ligation.

7.3.4 Grupo de controlo

Foram incluídos 15 doentes, submetidos a hemicolectomia direita, escolhidos aleatoriamente no período já referenciado anteriormente, por patologia benigna (n=4) ou maligna do Cólon (n=11). Este procedimento cirúrgico induz um aumento da PVP iatrogénico, sem alterar o remanescente hepático. O objectivo da inclusão deste grupo de controlo é comprovar que não houve alteração significativa da função e citólise hepáticas nos primeiros 30 dias em doentes a quem foi induzido um aumento significativo e abrupto da PVP, sem cirurgia de ressecção hepática associada.

A média das idades deste grupo é de $68 \pm 10,9$ anos, com predominância do género masculino (M=10; F=5). Nenhum dos doentes tinha história prévia de infecção biliar, cirrose hepática, hepatite vírica, hemocromatose ou exposição prévia a hepatotóxicos. Este grupo está caracterizado na Tabela 4.

Tabela 4 – características dos doentes incluídos no grupo de controlo

Caracterização do grupo de controlo	N	Média	%
Idade (anos)	-	68 ± 10,9	-
Género Masculino/Feminino	10/5	-	66,7/33,3
Infecção prévia	0	-	0
Diagnóstico			
Benigno ou Pré-maligno	4	-	26,67
- D. Crohn	1	-	6,67
- Adenoma	3	-	20
Maligno (Adenocarcinoma)	11	-	73,33
Hábitos alcoólicos	3	-	20
Tabagismo	4	-	26,67
Diabetes mellitus	8	-	53,33
Índice de massa corporal	-	27,27 ± 4,65	-
Karnofsky (ANEXO IX)	-	90,67 ± 14,38	-
ASA (mediana)	-	2	-
Morbimortalidade			
- sem complicações	9	-	60
Clavien Dindo (ANEXO X)			
- Grau I	3	-	20
- Grau II	3	-	20

ASA Score: American Society of Anaesthesiologists physical status

7.4.1 Medição da pressão venosa portal e procedimento cirúrgico

As técnicas de hepatectomia foram executadas de acordo com descrição prévia [137]. Nalguns pacientes foi utilizada clampagem intermitente não selectiva do pedículo hepático. Sob anestesia geral e monitorização invasiva, os doentes foram mantidos com baixa pressão venosa central para minimizar perdas hemáticas durante ressecção hepática.

A pressão venosa portal foi medida antes e após hepatectomia, através da introdução de um cateter de 1,4 Fr na veia porta, ligado ao transdutor que mede a pressão venosa durante a monitorização intra-operatória, após calibração.

7.4.2 Alteração da pressão venosa portal

A alteração da PVP, definida como a diferença entre os valores obtidos após e antes do procedimento, apresenta uma média de $2,33 \pm 3,7$ e mediana de 1.

7.4.3 Parâmetros avaliados (*End points*)

O principal “*End point*” deste trabalho é relacionar o aumento da PVP, antes e após hepatectomia, com:

- a) Alteração do tempo de protrombina (TP) e respectivo índice internacional normalizado (INR), bilirrubina total (BT), albumina, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), Gamma-glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), desidrogenase láctica (DHL) e creatinina, medidas por doseamento sérico no pré-operatório, às 24h, ao 5º e ao 30º dia pós-operatórios.
- b) *Score* de morbidade *Clavien-Dindo* [138]. (**ANEXO X**)
- c) A presença de insuficiência hepática de acordo com os “critérios 50-50” definidos por *Balzan et al.* [4] (**ANEXO V**) e pelo *International Study Group of Liver Surgery* (IGSLS) [139] (**ANEXO VI**).
- d) Mortalidade definida por morte nos primeiros 90 dias pós-operatórios.

Foram tidos em consideração vários factores que podem influenciar a relação em análise e nos quais existe heterogeneidade da amostra, designadamente:

- a) Idade
- b) Género
- c) Patologia maligna de base e estágio do tumor primário
- d) Infecções prévias à cirurgia
- e) Abrangência da lesão, graduada do seguinte modo: sem lesão hepática; atinge 1 a 2 segmentos; abrange 3 a 4 segmentos unilateralmente; abrange 3 a 4 segmentos bilateralmente; abrange mais de 4 segmentos.
- f) Portador de vírus de hepatite B

- g) Hábitos alcoólicos
- h) Hábitos tabágicos
- i) Diabetes mellitus
- j) Índice de massa corporal (IMC)
- k) Status funcional do doente definido pelo índice de Karnofsky em percentagem [140] (**ANEXO IX**).
- l) Quimioterapia após exérese de tumor primário.
- m) Quimioterapia administrada antes da hepatectomia com o intuito de tornar a neoplasia hepática ressecável (quimioterapia de conversão) ou como estratégia multimodal (quimioterapia de indução).
- n) Termoablação concomitante de metástases hepáticas no remanescente hepático.
- o) Embolização portal, com o intuito de incrementar o futuro remanescente hepático.
- p) Score de risco anestésico ASA (**ANEXO VIII**)
- q) Futuro remanescente hepático (FRH)
- r) Razão FRH/ peso corporal.
- s) Complexidade da cirurgia hepática, graduada segundo a tabela 5.

Tabela 5 – Complexidade da cirurgia hepática.

Graduação	Complexidade da cirurgia hepática
1	Metastasectomias /segmentectomias
2	Bisegmentectomia
3	Hepatectomia esquerda / bisegmentectomia + metastasectomias /
	Trisegmentectomia
4	Hepatectomia direita
5	Hepatectomia direita ou esquerda + metastasectomias ou termoablação
6	Hepatectomia direita ou esquerda + segmentectomia I
7	Hepatectomia central
8	Hepatectomia central + metastasectomias ou termoablação / ALPPS ou
	hepatectomia iterativa

- t) Tempo de clampagem do pedículo hepático expressa em minutos, considerado factor indutor de stresse oxidativo no parênquima hepático.

- u) Perda hemática estimada intra-operatória ou nas primeiras 24 h, expressa em ml, bem como a transfusão de unidades de glóbulos rubros no mesmo período, para além da necessidade de suporte vasopressor.

No grupo de controlo de 15 doentes submetidos a hemicolectomia direita avaliou-se a alteração da função e citólise hepáticas, através das variáveis já mencionadas no grupo de doentes submetidos a hepatectomia. Também foram considerados outros factores influenciadores do *outcome*, designadamente idade, género, patologia maligna de base e respectivo estadiamento, bem como antecedentes e status funcional do doente, para além das ocorrências intra-operatórias, como perda hemática estimada ou a necessidade de suporte transfusional ou vasopressor.

7.4.4 Análise estatística

A avaliação da normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi feita de acordo com o teste *Shapiro-Wilk*. A comparação de variáveis contínuas entre dois grupos independentes foi feita segundo o teste *t-Student* para amostras independentes ou segundo o teste U de *Mann-Whitney*, mediante a distribuição da amostra. Para as comparações entre variáveis categóricas recorreu-se ao teste χ^2 ou ao teste exacto de Fisher. Para as comparações entre variáveis ordinais ou quantitativas recorreu-se ao teste *Rho-Spearman* ou *Pearson*.

A análise *receiver operating characteristic* (ROC) foi aplicada para determinar o *cut-off* óptimo da aumento da PVP como preditor do *outcome*. Regressão linear foi aplicada para identificar preditores dos parâmetros de função hepática e citólise. Para identificar preditores de complicações major ou insuficiência hepática recorreu-se à regressão logística. Considerou-se uma significância de 0,05 para todas as comparações.

7.3 Resultados

8.3.1 Análise univariada

Neste modelo verificou-se que o aumento da PVP está associado a um agravamento da função de coagulação hepática às 24h, expressa pelo aumento do INR24 ($r=0,447$; $p<0,05$) e a um aumento do doseamento sérico da DHL às 24 horas ($r=0,542$; $p<0,01$), relativamente ao doseamento sérico pré-operatório destas variáveis, conforme ilustrado na tabela 6. Neste tempo de avaliação, não se verificaram outras correlações, à excepção de uma associação entre o aumento da PVP e um decréscimo da GGT (enzima indicadora de disfunção hepática) ($r=-0,414$; $p<0,05$), não acompanhada por outras alterações análogas e sem significância clínica neste contexto.

Tabela 6 – Correlação entre a alteração da PVP e a alteração das variáveis estudadas antes e após hepatectomia

	r (correlação)	p (significância)
INR24h	0,447	0,013
TP24h	-0,397	0,033
DHL24h	0,542	0,005
GGT 24h	-0,414	0,04
INR5	0,379	0,039
TP5	-0,387	0,038
INR30	0,414	0,032
FA30	0,701	0,0001
GGT30	0,525	0,007
CLAVIEN-DINDO	-	0,01
INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA (ISGLS)	-	p/2: 0,041
INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA (50-50)		n.s.
MORTALIDADE	-	n.s.

Ao 5º dia após hepatectomia, manteve-se a associação entre o aumento da PVP e a deterioração da coagulação, patente no aumento do INR ao 5º dia (INR5) ($R=0,379$; $p<0,05$) e na diminuição da TP (TP5) ($r=-0,387$; $p<0,05$), relativamente ao período pré-operatório. À semelhança da avaliação às 24 horas, não se verificou relação entre a deterioração da função excretora hepática e o aumento da PVP após hepatectomia. Tabela 6.

Ao 30º dia pós-operatório, a associação entre o aumento da PVP após hepatectomia e a deterioração da coagulação continua a existir, evidenciada pelo aumento de INR30 ($r=0,414$; $p<0,05$) e pela diminuição da taxa de protrombina (TP30) ($r=-0,459$; $p<0,05$), conforme mostrado na tabela 6. Para além disso, constata-se que o aumento da PVP está relacionado com o aumento do doseamento sérico da GGT ($r=0,525$; $p<0,01$) e da FA ($r=0,701$; $p<0,0001$) ao 30º dia, enzimas cujo doseamento sérico concomitante está elevado em contexto de disfunção hepática. Tabela 6.

O aumento da PVP durante a hepatectomia está associado à ocorrência de complicações major ($p<0,05$), definidas por um grau de complicação pós-operatória ≥ 3 , segundo a classificação de *Clavien-Dindo*. Além disso, o incremento da PVP tende a estar relacionado com o aparecimento de insuficiência hepática após hepatectomia, definida pelos critérios da ISGLS ($p<0,05$), conforme ilustrado na tabela 6. Nesta amostra não se verificou associação entre o aumento da PVP durante a hepatectomia e a insuficiência hepática de acordo com os “critérios 50-50”, nem com a mortalidade. Tabela 6.

Dos factores que poderiam interferir na associação estudada, nenhum revelou influenciar a relação entre a alteração da PVP e as variáveis do *outcome* analisadas. No entanto, se observarmos a influência de cada um destes factores nas variáveis do *outcome* que se revelaram estar associadas ao aumento da PVP durante a hepatectomia, verificamos que o aumento do FRH interfere na deterioração da coagulação às 24 horas (INR24h: $r=-0,492$; $p<0,01$) e ao 5º dia (INR5: $r=-0,474$; $p<0,01$) de tempo pós-operatório, a quimioterapia prévia à hepatectomia relaciona-se com a deterioração da coagulação ao 5º dia ($r=0,362$; $p<0,05$) e as perdas hemáticas ($r=0,470$; $p<0,05$) e o suporte vasopressor ($r=0,416$; $p<0,05$) estão associados a um aumento de DHL às 24 horas após cirurgia.

8.3.2 Análise multivariada

No modelo de regressão linear múltipla (Tabela 7), ao analisarmos o efeito cumulativo do incremento da PVP durante a hepatectomia e o FRH, verificamos que influenciam a função hepática de coagulação às 24 horas, sendo responsáveis por 32,5% da variância do INR ($r^2=0,325$; $p<0,01$). O aumento da PVP provoca agravamento do INR às 24 horas ($\beta=0,385$; $p<0,05$), enquanto, tal como esperado, o aumento do FRH tem efeito contrário no INR ($\beta=-0,355$; $p<0,05$).

Tabela 7 – Análise multivariada

MRLM	B	EPB	β	r^2
Eq 1 ($\uparrow$ INR 24)				0,325**
$\uparrow$ PVP	0,056	0,023	0,385*	
FRH	-0,672	0,304	-0,355*	
Eq 2 ($\uparrow$ INR 30)				0,358**
$\uparrow$ PVP	0,032	0,01	0,538**	
QTindução/conv	0,025	0,01	0,423*	
Eq 3 ($\uparrow$ FA 30)				0,611***
$\uparrow$ PVP	19,4	3,97	0,674***	
FRH	-97,8	44,1	-0,305*	
MRLS	B	EPB	β	r^2
Eq 3 ($\uparrow$ GGT30)				0,368**
∇ PVP	43,3	11,8	0,606**	
Eq 4 ($\uparrow$ INR5)				0,203*
$\uparrow$ PVP_classes	0,15	0,058	0,45*	
MRL	RR	IC 95%	p	
Eq 4 (Clavien-Dindo)				
Infecção prévia	3,1	0,369-26,1	0,297	
$\uparrow$ PVP ≥ 2	0,124	0,018-0,837	0,032	

MRLS: modelo de regressão linear simples. MRLM: modelo de regressão linear múltipla. MRL: modelo de regressão logística. RR: *Risk ratio*. INR: Índice Internacional Normalizado $\uparrow$ PVP: aumento da pressão venosa portal (Diferença entre a medição após e antes da hepatectomia). FRH: Futuro remanescente hepático. QT: quimioterapia. GGT: Gama-glutamil transferase. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

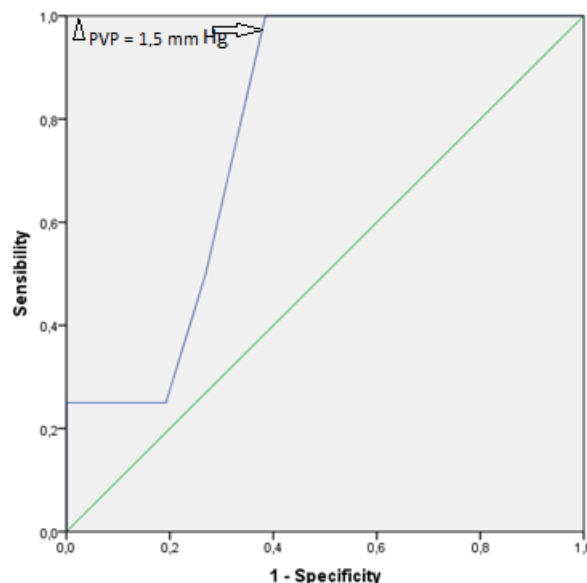
Adicionalmente, os resultados demonstram que o incremento da PVP e a exposição à quimioterapia previamente à hepatectomia deterioraram cumulativamente a coagulação, sendo responsáveis por 35,8% da variância do INR ao 30º dia pós-operatório ($r^2=0,423$; $p < 0,01$), através de um efeito positivo de ambos (PVP: $\beta=0,538$; $p < 0,01$) (QT: $\beta=0,423$; $p < 0,05$). Os resultados demonstram também que o incremento da PVP e o FRH

explicam 61,1% da variância do doseamento sérico da FA ao 30º dia pós-operatório ($r^2=0,611$; $p<0,001$), sendo que a primeira provoca um aumento do doseamento da FA ($\beta=0,674$; $p<0,001$) e o segundo tem um efeito contrário ($\beta=-0,305$; $p<0,05$). Esta evidência é corroborada pelo efeito semelhante que o incremento da PVP exerce no doseamento sérico da GGT ao 30º dia ($\beta=0,606$; $p<0,01$), sendo a responsável por 36,8% da variância da GGT ($r^2=0,368$; $p<0,01$).

8.3.3 Cut-off de incremento da PVP durante a hepatectomia

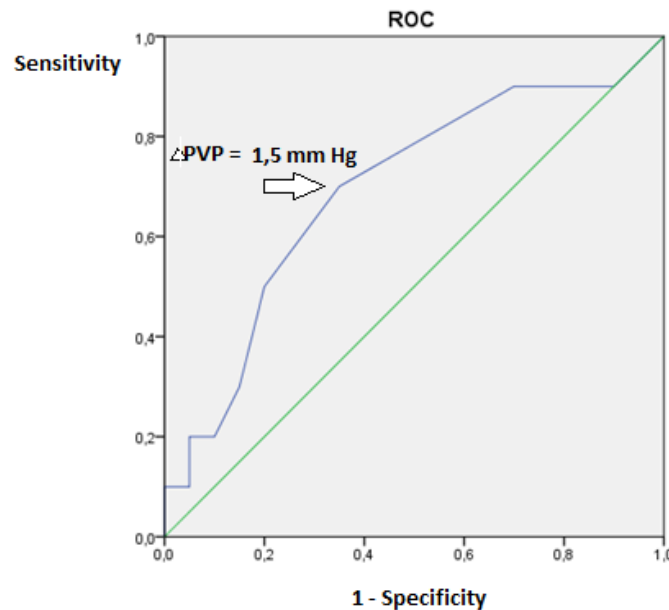
A curva ROC mostrou que um aumento da PVP durante a hepatectomia superior a 1,5 mm Hg é o *cut-off* ótimo para prever a ocorrência de insuficiência hepática (critérios ISGLS), com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 61,5% (área sobre a curva - AUC=0,78), conforme ilustrado na figura 1 .

Figura 1 – ROC (AUC = 0,78) usada para determinar o *cut-off* de aumento da PVP para a insuficiência hepática definida pelos critérios ISGLS.



De forma análoga, mostrou que o mesmo valor de aumento de PVP (1,5 mm Hg) é o *cut-off* ótimo para a ocorrência de complicações major (grau ≥ 3 da classificação de Clavien-Dindo), com uma sensibilidade de 70% e especificidade de 65% (AUC = 0,69), tal como se observa na figura 2 .

Figura 2 – ROC (AUC = 0,69) usada para determinar o *cut-off* de aumento de PVP para a ocorrência de complicações major



Reclassificando a alteração da PVP como uma variável dicotômica ($\uparrow$ PVP < 2 mm Hg e $\uparrow$ PVP $\geq$ 2 mm Hg), em análise univariada, confirmamos que os doentes submetidos a hepatectomia e que exibiam um aumento de PVP $\geq$ 2 mm Hg expressavam uma maior deterioração da função de coagulação às 24 horas (INR24h: $p < 0,01$), que se mantinha nos tempos de avaliação seguintes (INR5: $p < 0,05$) (INR30: $p < 0,05$), relativamente aos doentes com um aumento de PVP < 2 mm Hg. Esta deterioração da coagulação nos primeiros 30 dias após hepatectomia é corroborada pelo aumento do doseamento sérico da DHL às 24h ($p < 0,01$) e da fosfatase alcalina ao 30º dia ($p < 0,01$) no grupo de doentes com aumento da PVP $\geq$ 2 mm Hg.

Na regressão multivariada, constata-se que um aumento de PVP $\geq$ 2 mmHg é um factor independente para o agravamento da deterioração da coagulação após hepatectomia, sendo responsável por 23% do aumento do INR ao 5º dia pós-operatório ($r^2 = 0,203$; $p < 0,05$) – Tabela 7. Também se verifica, em modelo de regressão logística, que um aumento de PVP $\geq$ 2 mmHg durante a hepatectomia é um factor independente para a ocorrência de complicações major, observando-se que os doentes nesta condição têm uma

probabilidade acrescida de 8,1 vezes ($p < 0,05$) de terem complicações major relativamente ao grupo de doentes com um aumento de PVP < 2 mm Hg (Tabela 7).

8.3.4 Grupo de controlo

Nos doentes do grupo de controlo, submetidos a hemicolectomia direita sem ressecção hepática, nos quais é induzido um aumento iatrogénico de PVP sem alteração do remanescente hepático, verifica-se uma deterioração da função de coagulação hepática, expressa pelo aumento do INR ($p < 0,05$) e do TP ($p < 0,05$) nas primeiras 24 horas após cirurgia, em relação aos valores doseados pré-operatoriamente. Ao 5º e 30º dia pós-operatórios, verificou-se uma recuperação da função de coagulação hepática, face ao controlo pré-operatório. Concomitantemente, verifica-se uma diminuição do doseamento sérico da albumina nas primeiras 24 horas, face ao valor pré-operatório ($p < 0,01$), que não se mantém nos tempos seguintes.

Se analisarmos a citólise e as funções hepáticas excretoras e de síntese, não detectamos diferenças significativas nos primeiros 30 dias pós-operatórios.

7.4 Discussão

Este modelo demonstra que a alteração da PVP é um factor preditivo da deterioração da função de coagulação hepática às 24 horas após hepatectomia, quando analisada concomitantemente com o FRH. Além disso, fica patente que esta deterioração da coagulação se manteve ao 30º dia pós-operatório, se considerarmos a influência conjunta da exposição à quimioterapia prévia à hepatectomia. Este decréscimo funcional hepático é corroborado por um aumento do doseamento sérico da GGT e da FA ao 30º dia pós-operatório, indicadores analíticos de lesão hepática amplamente usados na prática clínica. Esta associação entre o aumento da PVP e a deterioração funcional hepática também se verificou no grupo de controlo nas primeiras 24 horas, no qual se induz um aumento da PVP sem ressecção hepática associada, indiciando que o aumento da PVP tem efeitos deletérios sobre o fígado, em conformidade com estudos anteriores [1,15,141–144]. No entanto, ao contrário dos doentes submetidos a hepatectomia, verificou-se uma recuperação da coagulação nos tempos de avaliação seguintes e uma concomitante ausência de outra disfunção hepática, indicando que a deterioração da função hepática após hepatectomia é multifactorial.

Tal como em estudos anteriores [1,6,145], este trabalho suporta a hipótese de que não é apenas a percentagem funcional de fígado remanescente a responsável pela deterioração da função hepática, mas também outros factores como o aumento da PVP após a hepatectomia e a exposição à quimioterapia antes da hepatectomia.

Investigações anteriores [1,146], baseadas na medição da PVP após hepatectomia ou THDV, atribuem um *cut-off* de 20 ou 21 mm de Hg de PVP, a partir do qual o risco de falência hepática é mais provável. Contudo, não consideram o valor basal da PVP pré-hepatectomia. Actualmente, apesar de compreendermos grande parte da fisiopatologia relacionada com o aumento da PVP após hepatectomia em modelos animais [15,147], os mecanismos subjacentes à alteração da PVP após hepatectomia são pouco conhecidos em humanos. Além disso, desconhece-se a variabilidade da PVP no modelo humano, assim como todos os factores que a influenciam. Assim sendo, parece mais fiável antever a ocorrência de disfunção hepática severa após hepatectomia se nos basearmos no incremento da PVP antes e após a hepatectomia e não numa única medição após a hepatectomia. Este problema torna-se ainda mais importante se, no futuro, permitir definir quais os doentes que poderiam beneficiar da implementação intra-operatória de uma manobra moduladora do influxo portal, a qual poderá ser uma estratégia eficaz na prevenção da falência hepática após hepatectomia [1,135,148].

Contudo, este modelo tem algumas limitações. Um deles é o pequeno tamanho da amostra. Outro problema é a selecção de variáveis para realizar a análise de regressão, quando está presente um número elevado de variáveis independentes candidatas à selecção. Para lidar com isso, uma selecção graduada foi realizada. No entanto, apesar dessas limitações, este modelo mostra que um incremento de PVP ≥ 2 mmHg após a hepatectomia piora a função de coagulação hepática durante os primeiros cinco dias de pós-operatório e acarreta um risco aumentado de complicações major. Este trabalho demonstra a necessidade de avaliar o incremento da PVP no intra-operatório, mas também pode influenciar outros estudos, contribuindo para a futura definição de indicações para modulação do influxo portal [148]

7.5 Conclusão

Neste modelo fica comprovado que uma elevação da PVP ≥ 2 mmHg durante a hepatectomia agrava a deterioração da função de coagulação hepática nos primeiros 5 dias pós-operatórios e acarreta um risco acrescido de ocorrência de complicações major. Não só evidencia a necessidade de avaliar intra-operatoriamente a alteração da PVP durante a hepatectomia, como também contribui para que, no futuro, possamos definir indicações para modular o influxo portal [148].

8. Impacto da laqueação da artéria esplénica após hepatectomia major na modulação do influxo portal, no modelo murino

8.1 Introdução

Inúmeras estratégias de modulação do influxo portal têm sido testadas, através da administração de fármacos, da execução de técnicas cirúrgicas ou mesmo em complementaridade, apesar da ausência de critérios para a sua implementação [93]. No entanto, apesar de produzirem conclusões importantes e expressarem resultados promissores, a sua exequibilidade clínica permanece controversa porque revelam um efeito inibitório sobre a regeneração hepática ou acarretam uma morbimortalidade não desprezível [27].

A laqueação da artéria esplénica como estratégia moduladora do influxo portal, ao diminuir o fluxo mesentérico-portal, poderá ser eficaz no controlo da pressão venosa portal após hepatectomia major, sem comprometer a regeneração hepatocelular, num período em que esta é primordial. Além disso, sendo uma técnica reproduzível que induz menor iatrogenia, quando comparada com outras técnicas já testadas, poderá ser no futuro eventualmente implementada na prática clínica. Propõe-se, por isso, efectuar uma avaliação do impacto desta manobra cirúrgica moduladora do influxo portal após hepatectomia de 85%, no modelo animal murino, observando os seus efeitos na função, regeneração e viabilidade hepatocelulares.

Material e métodos

8.2.1 Normas e aprovação éticas

Os diversos métodos e técnicas foram executados de acordo com as normas da Universidade de Coimbra. Os animais foram mantidos em condições de temperatura, luminosidade e humidade controladas, com acesso *ad libitum* a alimento e água acidificada. O estudo foi realizado de acordo com os princípios e procedimentos descritos com “3Rs” nas directrizes da EU (1986/697/EEC e 2010/63/EU), FELASA e o *National Centre for 3Rs*, também aprovados pelo Comité de Ética Animal do Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra e pela Direcção Geral da Alimentação e Veterinária (DGAV) com a referência 0116/000/000/2011 (**ANEXO XI**). Foram aplicados os princípios das directrizes ARRIVE para a análise e interpretação dos dados e realizados todos os esforços para minimizar o número de animais usados e o seu sofrimento.

8.2.2 Animais, plano de investigação e procedimentos cirúrgicos

Os animais de laboratório utilizados neste projecto foram 58 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), adquiridos à Charles River (Charles River, França), com 12 semanas de idade e com pesos compreendidos entre 200g e 300g. Os animais foram anestesiados por inalação de etoxietano.

Quarenta e oito animais foram divididos em 2 grupos: 24 ratos foram submetidos a hepatectomia de 85% (grupo Hx) e os restantes 24 ratos foram sujeitos a laqueação da artéria esplénica associada a hepatectomia de 85% (grupo Hx + LAE). Cada um destes grupos foi subdividido em 4 subgrupos de 6 animais cada, de acordo com o tempo de avaliação pós-operatória, designadamente: 24 horas, 48 horas, 72 horas e 120 horas após a cirurgia. Um grupo de controlo de 10 ratos, 5 dos quais submetido a hepatectomia de 85% e 5 restantes sujeitos a laqueação da artéria esplénica associada à hepatectomia de 85%, foram sacrificados ao 7º dia pós-operatório.

Descrição cirúrgica:

O acesso à cavidade abdominal efectuou-se por laparotomia mediana.

Secção de ligamento falciforme, hepatogástrico e hepato-duodenal. Isolamento e laqueação /secção pedicular intra-hepática de lobos lateral esquerdo, mediano e inferior lateral direito.

Excisão de lobos laqueados para executar a hepatectomia de 85%.

Laqueação da artéria esplénica em 50% dos animais (grupo Hx + LAE), preservando os vasos gástricos curtos para manter a irrigação arterial esplénica.

Revisão cuidada de hemóstase.

Limpeza da cavidade abdominal.

Encerramento da parede abdominal por sutura contínua em camada única.

Com o intuito de analisar o impacto da laqueação da artéria esplénica na função, viabilidade e regeneração hepatocitária, em cada um dos tempos previamente definidos após a cirurgia (24, 48, 72 e 120 horas) os 6 animais de cada subgrupo foram submetidos a estudo com recurso à medicina nuclear para avaliação da fracção de extracção hepatocitária (FEH) e posteriormente occisados, com o intuito de excisão do fígado, com o objectivo de: isolar hepatócitos e posteriormente avaliar a viabilidade celular / tipo de morte celular, níveis de stresse oxidativo, capacidade antioxidante e potencial de membrana mitocondrial, através de citometria de fluxo; analisar a lesão tecidular, grau de necrose /apoptose hepatocitária e capacidade de regeneração hepática (através de índice mitótico e Ki67) utilizando técnicas de histopatologia.

8.2.3 Avaliação da função de hepatocitária por medicina nuclear

Actualmente, os métodos mais sensíveis para estimar a função hepática são os testes dinâmicos, porque detectam mais precocemente pequenas alterações [9]. Um destes métodos é a fracção de extracção hepatocitária após administração intravenosa de ^{99m}Tc-Mebrofenina determinada por métodos radioisotópicos que, ao estimar a capacidade de captação e excreção do hepatócito, permite inferir acerca da função hepática [15].

Para estimar a função de extracção hepática, foram determinados 2 parâmetros: a fracção de extracção hepatocitária, que permite analisar a percentagem de radiofármaco excretada e que, em fígado saudável, é próxima de 100%; o tempo de redução a metade de actividade máxima, obtido na curva de excreção normalizada (T1/2) [149].

Para calcular a FEH, foi usado o ácido 3-bromo-2,4,6-trimetilacetanilidoiminodiacético marcado com ^{99m}Tc-Mebrofenina. O processo de marcação radioactiva foi efectuado por adição do ^{99m}Tc-pertecnetato de sódio eluído a fresco a um kit de mebrofenina (*Bridatec, 66 – Amersham health, Eindhoven, Netherlands*®), constituído por 40 mg de mebrofenina, em solução salina, associados a 0,3 mg de cloreto

de estanho di-hidratado. O controlo de qualidade foi sempre realizado antes da administração aos animais. O complexo ^{99m}Tc -mebrofenina formado é estável pelo menos durante 6 horas após o processo de radiomarcção. Tendo em conta a biodistribuição, relativamente à dosimetria, o órgão alvo que absorve a dose mais elevada estimada é o cólon ($9.2 \times 10^{-2} \text{ mGy/MBq}$). [149]

A cintigrafia com ^{99m}Tc -Mebrofenina foi efectuada nos 48 ratos após um período de jejum de pelo menos 6 horas. A aquisição dos dados obtida por uma câmara gama (GE Millennium MG, Milwaukee, WI, EUA) controlada por um computador de aquisição (GenieAcq, GE, Milwaukee, WI, EUA).

Os dados foram colhidos de forma dinâmica, após injeção de bólus de 185 MBq de ^{99m}Tc -mebrofenina na veia dorsal da cauda dos ratos, utilizando um colimador de baixa energia, alta resolução e uma matriz de 128x128 pixels, cada segundo durante o primeiro minuto, seguida por 59 aquisições de 60 segundos cada. Após a aquisição dinâmica, imagens estáticas antero-posteriores de 256x256 pixels foram obtidas com uma duração individual de 67 segundos, para correcção do decaimento. Os animais foram anestesiados com pentoxifilina, mantidos em decúbito dorsal e a área cardíaca estava incluída no campo de detecção. A discriminação energética foi centrada nos 140 KeV, com uma janela energética de 20%. Após aquisição, os dados foram transferidos para uma estação de trabalho Xeleris® para processamento das imagens [149].

Na sequência dinâmica de imagens, regiões de interesse (ROIs) foram assinalados sobre a região cardíaca e o fígado, evitando as ansas intestinais. Através de contagens totais, as curvas de tempos de actividade foram geradas pelas ROIs. A fracção de extracção hepatocitária foi calculada por análise de desconvolução da primeira curva de passagem. A seguir, o tempo de redução a metade de actividade máxima, obtido na curva de excreção normalizada ($T_{1/2}$) foi calculado. Valores de $98,5 \pm 2,7\%$ para a FEH e $20,9 \pm 14,6$ minutos para o $T_{1/2}$ foram considerados normais [149].

8.2.4 Isolamento hepatocitário

As amostras de fígado foram obtidas após a occisão do animal. Os fragmentos colhidos foram colocados numa solução com colagenase IV (Gibco) em tampão HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethane-sulfonic acid) (5mg/ml) a 37°C, e submetido a

agitação suave durante 10 minutos permitindo a sua desagregação. O homogeneizado assim obtido, foi filtrado através de um filtro de 30 μm , centrifugado a 500xG à temperatura de 19°C e retirado o sobrenadante. O *pellet* obtido foi re-suspenso em 5 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e centrifugado, tendo-se repetido este procedimento três vezes, com o objectivo de remover a colagenase IV. Após a última lavagem as células foram re-suspensas em 5ml de DMEM [150,151].

Os hepatócitos isolados das amostras colhidas em cada um dos animais dos respectivos grupos foram analisados, através de citometria de fluxo, para avaliar a viabilidade e tipo de morte celular, o stresse oxidativo e o potencial de membrana mitocondrial.

8.2.5 Citometria de fluxo: definição e explicação da metodologia

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar células ou outras partículas biológicas microscópicas suspensas em meio líquido. Este método permite analisar simultaneamente, num curto período, múltiplas características físicas e químicas de células em suspensão através de um aparelho de detecção óptico-electrónico. Neste aparelho, um feixe de luz de um único comprimento de onda é direccionado para um meio líquido em fluxo. Vários detectores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz; um na linha do feixe de luz (*forward scatter*, *FSC*) e vários perpendiculares a este *side scatter* (*SSC*), além de um ou mais detectores fluorescentes. Cada partícula suspensa que passa através do feixe dispersa a luz de uma forma específica e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula ou a ela ligados podem ser excitados emitindo luz de menor frequência (ou maior comprimento de onda) do que o da fonte de luz. Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detectores e, por análise das flutuações de brilho de cada detector (uma para cada pico de emissão fluorescente), é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada partícula individual. A *FSC* correlaciona-se com o volume celular e a *SSC* depende da complexidade interna da partícula (por exemplo a forma do núcleo, a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana) [149,152].

Neste trabalho, a citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a viabilidade e tipo de morte celular, o stresse oxidativo e o potencial de membrana mitocondrial. Foi utilizado um

citómetro de fluxo de 6 parâmetros e 4 cores FACS Calibur™ (Becton Dickinson®), equipado com laser de argon de 15 mW. Para cada uma das marcações foram necessárias aproximadamente 10^6 células. Foram adquiridos pelo menos 10^4 eventos, obtidos através do *software* CellQuest^{MR} (Becton Dickinson®). Para a análise e quantificação da informação utilizou-se o *software* Paint-a-Gate 3,02 (Machintosh®) [149,152–154].

8.2.6 Variáveis estudadas por citometria de fluxo

8.2.6.1 Viabilidade e tipo de morte celular

Para a análise destas variáveis foram utilizados dois fluorocromos diferentes, a Anexina V (An-V) e o Iodeto de Propídeo (IP), que permitem quantificar a viabilidade celular e distinguir os diferentes tipos de morte celular, a necrose e a apoptose. A An-V permite identificar as células que se encontram em apoptose, pois este fluorocromo liga-se especificamente à fosfatidilserina, um fosfolípido da bicamada lipídica que, nas células em apoptose, se desloca do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. De forma complementar, o IP é um corante que se intercala no DNA das células, marcando os núcleos daquelas que se encontram em apoptose tardia ou necrose [149,152].

Recorrendo à dupla marcação com An-V/IP, é possível distinguir quatro grupos de células: o grupo I, a que correspondem as células vivas; o grupo II, que engloba as células que se encontram em apoptose inicial; o grupo III, que inclui as células que se encontram em apoptose tardia/necrose; e o grupo IV, que contém as células que se encontram em necrose. Deste modo, as células pertencentes ao grupo I, isto é, as células vivas, apresentam-se negativas tanto para a marcação com An-V como para a marcação com IP. As células incluídas no grupo II, em apoptose inicial, apresentam-se positivas para a marcação com An-V e negativas para a marcação com o IP. As células que se apresentam positivas para as duas marcações, encontram-se em apoptose tardia/necrose, pelo que compõem o grupo III, enquanto as células em necrose, que constituem o grupo IV, apresentam-se negativas para a marcação com An-V e positivas para a marcação com o IP. Esta explicação está sumariada na tabela 8 [149,152].

Tabela 8 - Padrões de marcação com An-V / IP para os diferentes grupos de células

Padrões de marcação com An-V / IP		
Grupos	Anexina V	Iodeto de propídeo
Grupo I - Células vivas	-	-
Grupo II - Células em apoptose inicial	+	-
Grupo III - Células em apoptose tardia/necrose	+	+
Grupo IV - Células em necrose	-	+

Para marcação com An-V/IP, utilizaram-se 10^6 células obtidas após centrifugação de uma suspensão celular a 300xG durante 5 minutos. De seguida, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* uma vez com FACSFlow^{MR} (BD Biosciences®). Posteriormente, o *pellet* foi incubado com 100 µl de tampão de ligação (KIT Immunotech^{MR}), 1ml de An-V (KIT Immunotech^{MR}) e 5ml de IP (KIT Immunotech^{MR}), durante 15 minutos a 4°C, no escuro. Após a incubação, adicionaram-se 400 µl de FACSFlow^{MR} e efectuou-se a análise no citómetro FACSCalibur^{MR} (BD Biosciences®), utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525 nm para a An-V e 640 nm para o IP [149,152]. Os resultados aparecem sob a forma de percentagem de células presentes em cada grupo.

8.2.6.2. Stresse oxidativo e capacidade antioxidante

Tal como mencionado previamente, a falência hepática após hepatectomia major está relacionada com o stresse oxidativo a que os hepatócitos são sujeitos neste período [15,27,28]. Para analisar o efeito da laqueação da artéria esplénica no stresse oxidativo hepatocitário induzido pela hepatectomia major, foram avaliadas, por citometria de fluxo, as seguintes variáveis: a acumulação de radicais livres de oxigénio (doravante designados por peróxidos), a produção intracelular de radical superóxido e a capacidade antioxidante.

Avaliação da produção intracelular de peróxidos

A expressão intracelular de peróxidos nos hepatócitos foi determinada por citometria de fluxo através da oxidação intracelular da sonda não fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA). Este composto lipossolúvel entra nas células e acumula-se principalmente no citosol, onde é desacetilado por esterases intracelulares e convertido em DCFH. Este produto não fluorescente é oxidado na presença de peróxidos, convertendo-se em 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto que é facilmente visualizado pela emissão de fluorescência no comprimento de onda de 529 nm, quando excitada com luz de comprimento de onda de 504 nm (Figura 3). A fluorescência é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares, nomeadamente do peróxido de hidrogénio [149,152,155].

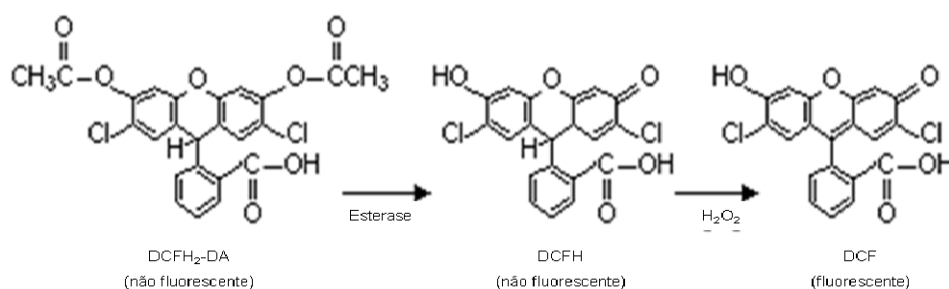


Figura 3 - Detecção de peróxidos intracelulares (adaptado de <http://media.wiley.com>).

Para avaliação da produção de peróxidos, centrifugou-se uma suspensão celular com aproximadamente 10⁶ células a 200xG durante 5 minutos, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se tampão fosfato-salino (PBS) para lavar. O sedimento foi re-suspenso em 100 ml de PBS e foi incubado durante 45 minutos sem luz a 37°C com 5 ml de DCFH₂-DA (*Molecular probes, Invitrogen^{MR}*) dissolvido em dimetilformamida na concentração de 1mM de modo a obter a concentração final de 5 µM. A suspensão foi lavada com PBS por centrifugação a 3000xG durante 5 minutos e re-suspensa em 400 ml do mesmo. Posteriormente, foi feita a detecção por citometria de fluxo com uma excitação e emissão nos comprimentos de onda de 504 nm e 529 nm, respectivamente. Os resultados obtidos foram analisados em termos da média das intensidades de fluorescência (MIF) [149,152,155].

Avaliação da produção intracelular de radical superóxido

A avaliação da produção de radical superóxido foi efectuada por citometria de fluxo com recurso ao dihidroetídeo (DHE). Este composto atravessa facilmente as membranas celulares e é convertido pelo radical superóxido a etídeo (Figura 4), composto fluorescente de cor vermelha que se intercala no DNA, permanecendo no interior da célula. Esta reacção é relativamente específica para o radical superóxido com oxidação mínima pelo peróxido de hidrogénio, peróxido de nitrito ou ácido hipocloroso [152,155].

Utilizaram-se aproximadamente 10^6 células obtidas após centrifugação de uma suspensão celular a 200xG durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento lavado uma vez com PBS. De seguida, o sedimento foi re-suspensão em 1000 ml de PBS, adicionou-se 5 ml de DHE (Sigma^{MR}) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1mM, de modo a obter uma concentração final de 5 μ M. Incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente e sem luz. Após a incubação, a suspensão foi lavada com PBS por centrifugação a 300xG durante 5 minutos e re-suspensão em 400 ml do mesmo tampão. A detecção foi efectuada utilizando o comprimento de onda de excitação de 620nm. Os resultados são expressos em MIF [152].

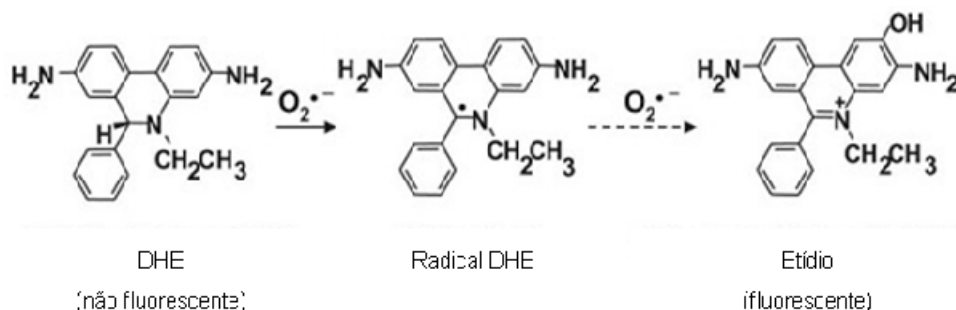


Figura 4 - Detecção de radical superóxido intracelular. O DHE é convertido pelo radical superóxido a etídeo, um composto fluorescente que se intercala no DNA (adaptado de Robinson *et al.* 2006).

Capacidade antioxidante

Para avaliar a aptidão dos hepatócitos para resistir ao stresse oxidativo, foi analisada a expressão intracelular de glutathiona reduzida (GSH), que constitui o antioxidante endógeno com maior expressão *in vivo*, participando directamente na neutralização de

radicais livres e espécies reactivas de oxigénio. A sua concentração intracelular é proporcional à estimativa da capacidade antioxidante da célula [152,155].

A expressão de GSH foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o composto fluorescente alaranjado de mercúrio. Este composto liga-se estequiometricamente aos grupos sulfidrílicos de mercúrio, formando canais fluorescentes. No entanto, este composto reage mais rapidamente com a GSH do que com os grupos sulfidrílicos das proteínas, emitindo uma intensa fluorescência vermelha, quando excitado com laser de argon a um comprimento de onda de 488 nm [152]. Uma suspensão de 10^6 células foi incubada com 4 µl de mercúrio laranja (Sigma 83377^{MR}) em acetona (Sigma 650501^{MR}), durante 15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após lavar as células com PBS, a análise foi efectuada utilizando o comprimento de onda de excitação de 620nm. Os resultados são expressos em MIF [152].

8.2.6.3 Potencial de membrana mitocondrial

A sinalização mitocondrial regula a comunicação entre a mitocôndria e o núcleo, influenciando muitas respostas celulares, sob diversas condições normais ou fisiopatológicas [156]. Durante a oxidação do substrato, perante a acumulação de radicais livres de oxigénio, a mitocôndria produz um potencial de membrana, sob a forma de gradiente de protões, através da camada interna da sua membrana, permitindo regular a sinalização com o núcleo celular e promover mecanismos de defesa celular [156]. Neste contexto, a avaliação do potencial de membrana mitocondrial permite aferir a capacidade de adaptação celular ao stresse oxidativo, apesar de outros factores o poderem influenciar, designadamente a apoptose, a concentração extracelular de factores de crescimento ou os níveis de glicose intracelular [157].

Baseando-se neste conceito, a integridade da camada interna da membrana mitocondrial foi avaliada pela análise do gradiente de potencial desta membrana, através de citometria de fluxo, usando uma sonda fluorescente, o 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol carbocianina (JC-1). O potencial de membrana mitocondrial determina a captação selectiva do JC-1 pela mitocôndria. O JC-1 é um catião lipofílico que existe em duas formas, monómeros e agregados, consoante o estado de polarização ou despolarização da membrana mitocondrial, emitindo fluorescência a comprimentos de onda diferentes. Quando o potencial de membrana é elevado, forma agregados que

emitem fluorescência vermelha a 590 nm. Por sua vez, à medida que o potencial de membrana mitocondrial diminui, ou em casos em que a membrana se encontra despolarizada, o JC-1 é excluído da mitocôndria e mantém-se no citoplasma sob a forma de monómeros que emitem fluorescência verde a 529 nm, conforme ilustrado na Figura 5. Assim, a razão entre a fluorescência verde e vermelha (monómeros/agregados), determinada por citometria de fluxo, fornece uma estimativa do potencial de membrana mitocondrial [152].

Para este efeito, aproximadamente 10^6 células foram centrifugadas com PBS durante 5 minutos a 200G e posteriormente re-suspensas em 1 ml do mesmo tampão. Seguidamente, as suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos à temperatura de 37°C e ao abrigo da luz com 1 ml de JC-1 (*Molecular probes^{MR}, Invitrogen[®]*), preparado em DMSO na concentração de 1 mM, de modo a obter uma concentração final de 5mg/ml. Posteriormente, a suspensão foi novamente lavada com PBS e re-suspensa em 400 ml do mesmo tampão. A detecção foi efectuada utilizando o comprimento de onda de excitação de 488nm. Os resultados obtidos são expressos como MIF para os agregados e para os monómeros, tendo-se calculado posteriormente a razão monómeros/agregados [149,152,154].

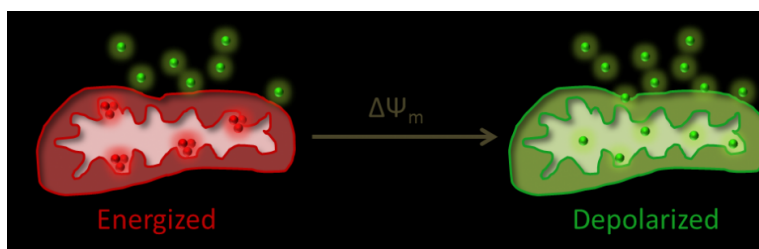


Figura 5 – Localização de JC-1 conforme estado de polarização de membrana mitocondrial

8.2.7. Análise histopatológica

As amostras de fígado excisadas foram colhidas e fixadas em formol tamponado a 10%, em frascos devidamente referenciados com os números de identificação de cada animal. Para cada fragmento de fígado colhido, foi efectuada descrição macroscópica designadamente tamanho, superfície externa, superfícies de corte, cor, textura e

consistência. Posteriormente, os fragmentos foram automaticamente processados em *Shandon Excelsion ES*[®] e incluídos em parafina. Para o exame microscópico, as amostras foram seccionadas em cortes de 3 µm de espessura, processados e fixados em hematoxilina e eosina [158]. Todos os procedimentos foram registados em cada uma das *Check lists* individuais, uma por cada animal (**ANEXO XII**). Para o procedimento imunohistoquímico, as amostras foram processadas nas 48 horas após a colheita, utilizando *Novocasta Novolink detection kit*^{MR} (*Leica*[®]), de acordo com protocolo descrito por *Tsutsumi et al.* [159]. Cortes congelados de biópsias hepáticas dos animais, de 4 µm de espessura, foram preparadas usando lâminas de vidro revestidas por 3-aminopropiltrimetoxisilano. Posteriormente, os cortes obtidos foram fixados, com ou sem secagem, à temperatura ambiente durante 10 minutos. O antígeno Ki-67 é detectado por anticorpos policlonais ligados a um polímero sintético. Os anticorpos diluídos (50 µl) foram incubados à temperatura ambiente, durante 5 minutos. A suspensão foi seguidamente lavada com PBS, a um pH de 7,2 durante 1 minuto. A reacção de coloração foi efectuada por imersão dos cortes em solução de 20 mg/dl de 3,3'diaminobenzidinatetrahidroclorido + 0,003% de peróxido de hidrogénio a 0,05 mol/l tamponada em Tris-HCl a um pH de 7,6, com ou sem adição de 10 mmol/l de imidazol, durante 10 minutos. Os núcleos foram contrastados, durante 15 segundos, com solução de verde de metilo a 5% tamponada por 0,1 mol/l de acetato veronal a um pH de 4,0. A actividade das peroxidases endógenas foi bloqueada por imersão dos cortes em solução de metanol contendo 0,3% de peróxido de hidrogénio, durante 5min, previamente à incubação dos anticorpos.

Nas amostras processadas foi analisada a presença ou ausência de sinais de lesão tecidual, estimada a necrose / apoptose hepatocitária e avaliada a regeneração hepatocitária.

8.2.7.1. Lesão tecidual

Os cortes histológicos obtidos e fixados em hematoxilina e eosina foram avaliados, quanto à presença ou ausência, em 50 campos de grande ampliação, de alguns parâmetros de lesão tecidual nomeadamente, balonização hepatocitária, esteatose microvesicular e agregados de polimorfonucleares neutrófilos [160,161] Os resultados obtidos são expressos em percentagem de cada um dos marcadores de lesão tecidual mencionados.

8.2.7.2 Necrose / apoptose hepatocitária

A necrose / apoptose hepatocitária foi estimada em função do número de focos de necrose por campo de média ampliação (objectiva 10x) e classificada em quatro categorias: mínima (<2 focos); discreta (2-4 focos); moderada (5-10 focos) e grave (>10 focos ou “em ponte”) [162,163]. Os resultados obtidos são expressos em percentagem de cada uma das categorias referidas para cada subgrupo de animais.

8.2.7.3 Regeneração: índice mitótico e Ki67

Para investigar a regeneração hepatocitária, foram determinados a actividade mitótica e o índice proliferativo.

O índice mitótico foi determinado pela contagem do número de mitoses existentes em 10 campos de grande ampliação consecutivos (objectiva 40x/0,57) [163]. Os resultados observados são expressos em média de mitoses $\pm$ desvio padrão.

O estudo imunohistoquímico com o anticorpo Ki67 permitiu uma avaliação quantitativa do índice proliferativo pela determinação da percentagem de núcleos hepatocelulares positivos em 1000 hepatócitos [164]. Os resultados obtidos são expressos em percentagem de núcleos hepatocelulares positivos $\pm$ desvio padrão.

8.2.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do *software* estatístico IBM SPSS^{MR} (versão 21.0). O teste *Shapiro-Wilk* foi usado para testar a normalidade de distribuição para variáveis contínuas. Para as variáveis com distribuição normal foram usados testes paramétricos, enquanto para as variáveis sem esta distribuição foram utilizados testes não paramétricos. Para comparar diferenças entre os grupos Hx e Hx+LAE, foi usado o teste – *U de Mann-Whitney* ou o teste – *t* de amostras independentes. Foi realizada análise de variância ou o teste *Kruskal-Wallis* para comparar variáveis contínuas entre os 4 subgrupos, definidos pelo tempo de avaliação pós-operatória (24h, 48h, 72h e 120h). Comparações múltiplas foram efectuadas mediante a correcção de *Bonferroni*.

Todos os testes de significância são bi-caudais e a significância estatística foi considerada para $p < 0.05$.

Resultados

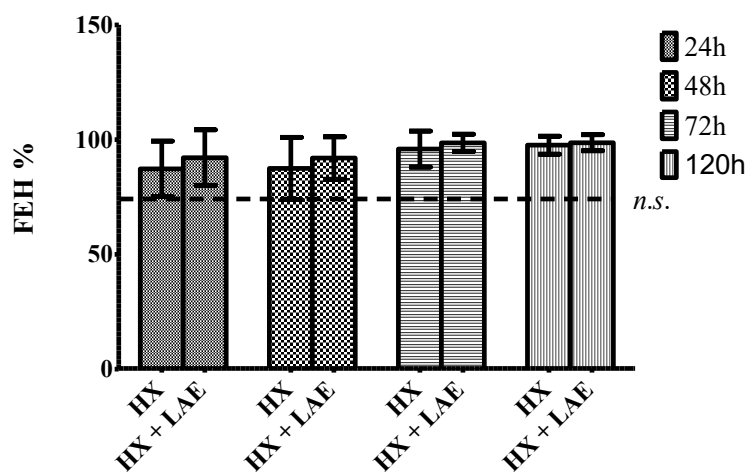
8.3.1 Mortalidade

Não se verificou mortalidade no grupo de controlo de 10 animais, submetido a hepatectomia de 85% com (5 ratos) ou sem laqueação da artéria esplénica (5 ratos), ao 7º dia pós-operatório.

8.2.2 Fracção de extracção hepatocitária por métodos radio-isotópicos

Quando avaliada a FEH, não se verificaram diferenças ao longo do tempo, quando efectuada hepatectomia de 85% (Hx), conforme ilustrado na Figura 6. Resultados similares foram obtidos quando se associou a laqueação da artéria esplénica a este procedimento cirúrgico. A LAE induziu um decréscimo do T1/2 às 48h ($p < 0,001$) e às 72h ($p = 0,052$), com recuperação deste às 120h (figura 7).

Fracção de extracção hepatocitária (FEH)



	24h		48h		72h		120h	
	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ
Hx	87,25	12,09	87,44	13,57	95,9	7,85	97,6	3,91
Hx+IAE	92,13	12,15	92	9,23	98,57	3,78	98,63	3,5

Figura 6 - Fracção de extracção hepatocitária avaliada por métodos radio-isotópicos (FEH expressa em percentagem média; n.s. = sem significância estatística; μ = média; σ = desvio padrão)

Tempo de redução a metade de actividade máxima, obtido na curva de excreção normalizada (T1/2)

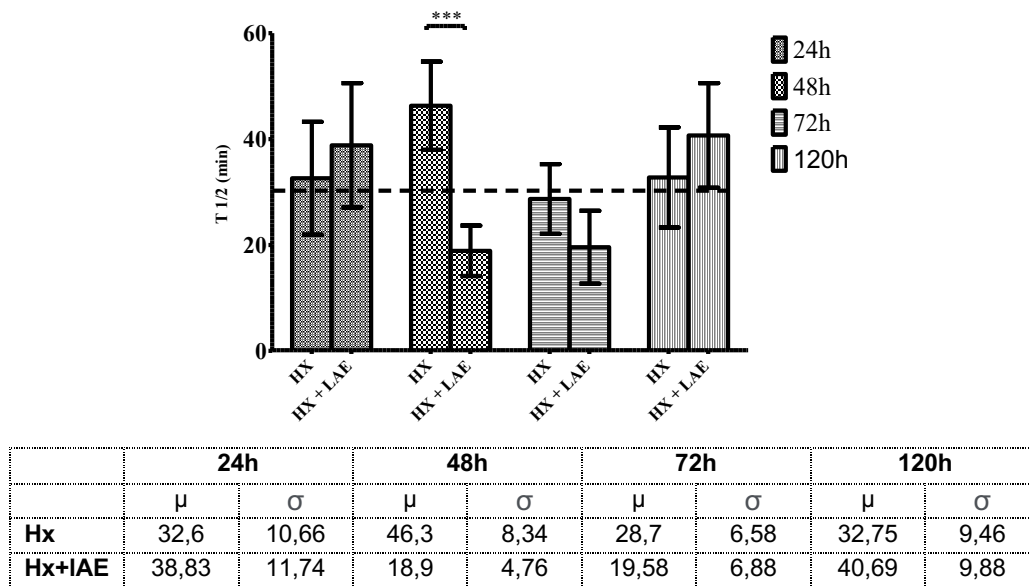


Figura 7 – Tempo de redução a metade de actividade máxima, obtido na curva de excreção normalizada (T1/2) expresso em média de minutos ± desvio padrão. (p<0,001; **p<0,01; *p<0,05. μ= média; σ= desvio padrão).**

8.3.3 Viabilidade celular

Tal com exposto na figura 8a, não se verificaram diferenças nas células vivas ao longo do tempo no grupo Hx+LAE. Contudo, no grupo Hx verificou-se um decréscimo gradual e significativo de células vivas ($p<0,001$) ao longo do tempo.

Em ambos os grupos, observou-se um aumento da apoptose inicial às 48h (Fig. 8b) ($p<0,001$), menos pronunciado no grupo Hx+LAE e que desvaneceu nos tempos seguintes ($p < 0,01$ 48h – 72h no grupo Hx versus $p < 0,001$ 48h – 72h no grupo Hx+LAE).

Conforme ilustrado na Figura 8c, verificou-se um aumento da apoptose tardia/necrose em ambos os grupos, mais marcado no grupo Hx ($p < 0,001$ no grupo Hx versus $p = 0,004$ no grupo Hx+LAE) às 72h. Às 120h esta tendência mantém-se embora sem significado estatístico. Em relação à necrose, verificou-se um aumento desta às 120h no grupo Hx, comparando com tempos precedentes ($p<0,001$), o que não se observou no grupo Hx+LAE (Figura 8d).

Comparando os grupos Hx e Hx+LAE, notou-se um aumento progressivo das células vivas no grupo submetido a LAE ($p<0,001$) (Figura 8a), um aumento de apoptose inicial às 24h mais marcado no grupo Hx ($p<0,01$) (Figura 8b), um aumento da apoptose tardia/necrose às 72h neste grupo ($p<0,001$) (Figura 8c), acompanhado de um gradual aumento de necrose mais expressivo às 120h nos ratos não submetidos a LAE ($p<0,001$) (Figura 8d).

Figura 8 (a) – Células vivas expresso em média de percentagem de células vivas $\pm$ desvio padrão. (** $p<0,001$; * $p<0,01$; * $p<0,05$. -- Linha basal em grupo de controlo sem qualquer procedimento).

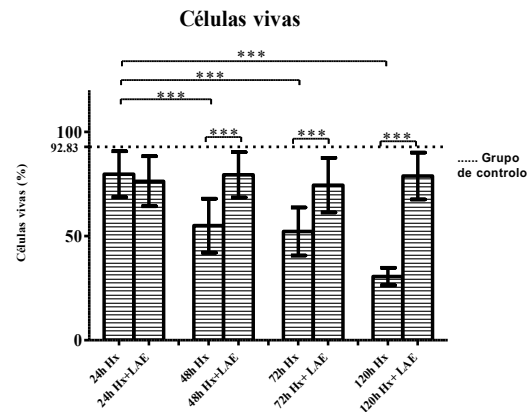


Figura 8 (b) – Células em apoptose inicial expresso em média de percentagem de células em apoptose inicial $\pm$ desvio padrão. (** $p<0,001$; * $p<0,01$; * $p<0,05$. -- Linha basal em grupo de controlo sem qualquer procedimento).

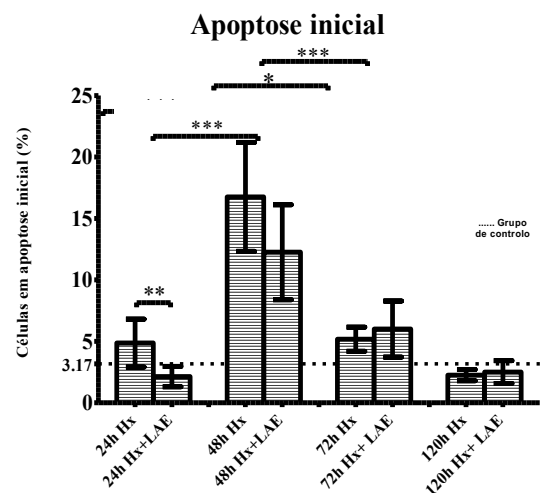


Figura 8 (c) – Células em apoptose tardia/necrose expresso em média de percentagem de células em apoptose tardia/necrose $\pm$ desvio padrão. (** $p<0,001$; * $p<0,01$; * $p<0,05$. -- Linha basal em grupo de controlo sem qualquer procedimento).

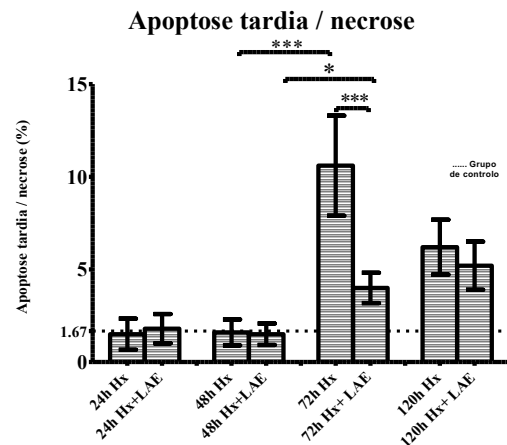
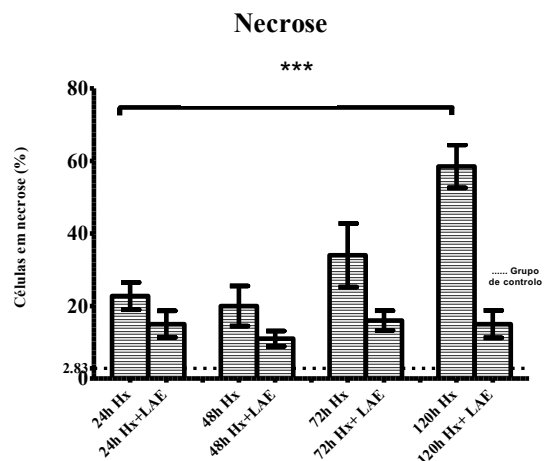


Figura 8 (d) – Células em necrose expresso em média de percentagem de células em necrose $\pm$ desvio padrão. (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. -- Linha basal em grupo de controlo sem qualquer procedimento).



	Células vivas		Apoptose inicial		Apoptose tardia / necrose		Necrose	
	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ
24h Hx	79,67	11,02	4,86	1,95	1,5	0,84	22,75	3,77
24h Hx+ LAE	76,31	12,02	2,13	0,83	1,8	0,79	15	3,67
48h Hx	55	12,98	16,75	4,43	1,6	0,7	20	5,52
48h Hx+ LAE	79,4	10,9	12,25	3,86	1,5	0,58	11	2,12
72h Hx	52,2	11,56	5,17	0,98	10,6	2,7	34	8,76
72h Hx+ LAE	74,43	13,11	6	2,28	4	0,82	16	2,71
120h Hx	30,57	4,2	2,25	0,46	6,2	1,48	58,5	5,93
120h Hx+ LAE	78,83	11,24	2,5	0,93	5,2	1,3	15	3,79

Figura 8 – Avaliação da viabilidade e morte celular por citometria de fluxo.

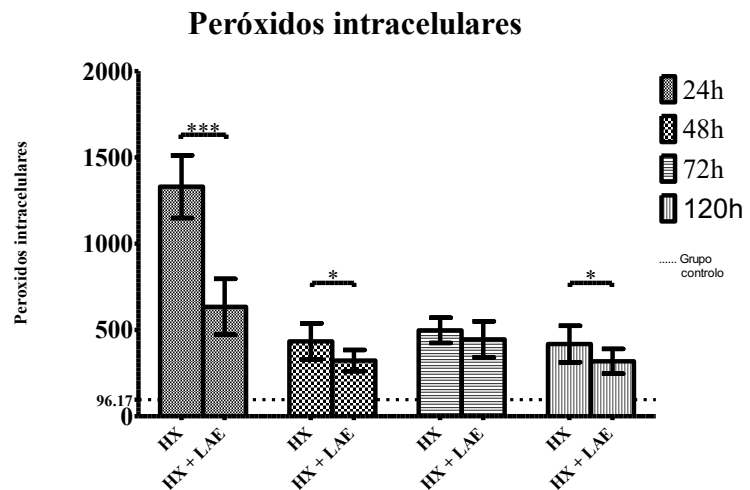
8(a) – Células vivas. 8 (b) – Células em apoptose inicial. 8 (c) – Células em apoptose tardia / necrose. 8 (d) – Células em necrose. (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. μ = média; σ = desvio padrão)

8.3.4. Stresse oxidativo e capacidade antioxidante

Ao analisar a acumulação intracelular de peróxidos (Figura 9a), observou-se, às 24h, um aumento significativo da produção intracelular de peróxidos em ambos os grupos ($p < 0,05$), mais expressivo no grupo sem LAE ($p < 0,001$), diferença que se mantém significativa, entre os dois grupos (com e sem LAE) às 48h e 120h ($p < 0,05$).

Figura 9 (a) – Peróxidos

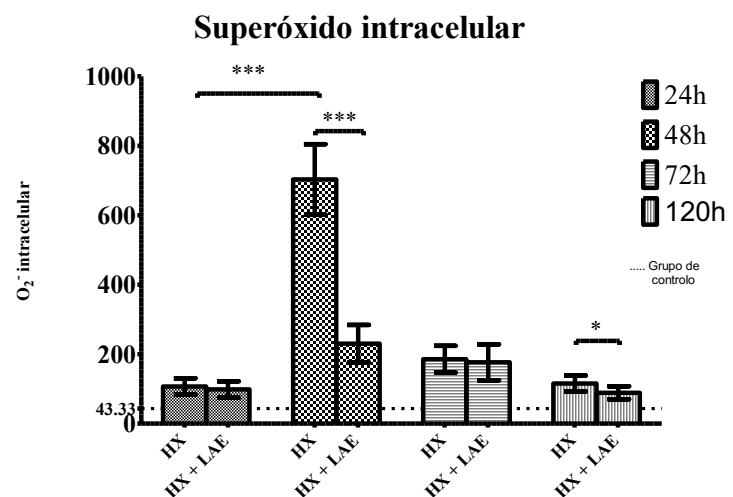
intracelulares expresso em média das intensidades de fluorescência (MIF) $\pm$ desvio padrão. (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. -- Linha basal em grupo de controlo sem qualquer procedimento).



	24h		48h		72h		120h	
	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ
Hx	1330,75	181,52	434	104,6	498	73,21	418,75	105,52
Hx+IAE	634,29	161,8	322,78	61,36	445,5	104,3	318,4	71,66

Figura 9 (b) – Superóxido

intracelular expresso em média das intensidades de fluorescência (MIF) $\pm$ desvio padrão. (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. -- Linha basal em grupo de controlo sem qualquer procedimento).



	24h		48h		72h		120h	
	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ
Hx	106,88	23,65	703,2	101,56	185,5	38,6	115,5	22,97
Hx+IAE	98,58	23,45	230,33	53,9	176,6	51,76	88,78	18,61

Figura 9 – Avaliação do stresse oxidativo por citometria de fluxo. (a) Peróxidos intracelulares. (b) Superóxido intracelular. Resultados expressos em média das intensidades de fluorescência (MIF) $\pm$ desvio padrão. (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. -- Linha basal em grupo de controlo sem qualquer procedimento. μ = média; σ = desvio padrão)

De forma similar, notou-se incremento de acumulação de superóxido intracelular às 48h em ambos os grupos, mais pronunciado no grupo não submetido a LAE ($p < 0,001$), diferença que se mantém significativa, entre os grupos Hx e Hx+LAE, às 120h ($p < 0,05$) (Figura 9b).

Verificou-se um aumento da capacidade antioxidante, avaliada pela expressão de GSH, às 24h em ambos os grupos ($p < 0,001$), mais marcado no grupo submetido a LAE ($p < 0,05$), conforme observado na Figura 10.

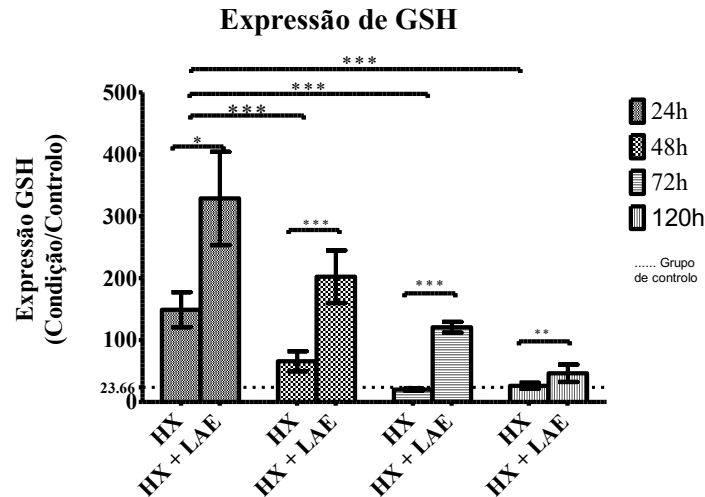
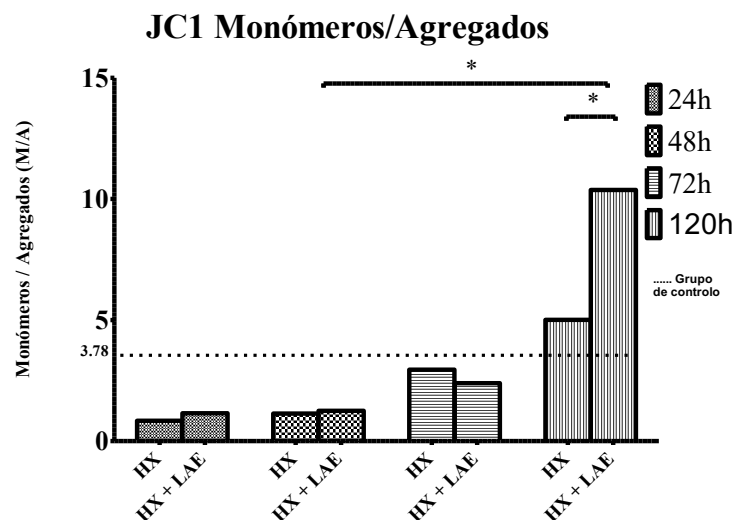


Figura 10 – Avaliação da capacidade antioxidante através da expressão de GSH por citometria de fluxo. Resultados expressos em média das intensidades de fluorescência (MIF) $\pm$ desvio padrão. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$. -- Linha basal em grupo de controle sem qualquer procedimento. μ = média; σ = desvio padrão).

8.3.5 Estimativa do potencial de membrana mitocondrial

Às 120h houve um decréscimo significativo do potencial de membrana mitocondrial (expresso pelo aumento da razão monómeros/agregados de JC-1), em ambos os grupos, sendo de realçar que às 120h se verificou um aumento especialmente significativo comparativamente às 48h ($p < 0,05$). (Fig. 11)



	24h		48h		72h		120h	
	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ
Hx	0,84	0,44	1,14	0,4	2,95	0,74	5,01	2,37
Hx+IAE	1,15	0,47	1,25	0,3	2,39	0,79	10,37	2,65

Figura 11 – Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo usando a sonda JC-1. Um aumento da razão monómeros/agregados indica decréscimo de potencial de membrana mitocondrial. Resultados expressos em média de razão monómeros/agregados $\pm$ desvio padrão. (** $p < 0,001$; * $p < 0,01$; $p < 0,05$. -- Linha basal em grupo de controle sem qualquer procedimento. μ = média; σ = desvio padrão).

8.3.6. Análise histológica

8.3.6.1 Lesão tecidual

No que respeita à lesão tecidual, apresentam-se os resultados expressos em percentagem, para cada um dos marcadores de lesão estudados.

Conforme se ilustra na Figura 12, observou-se um incremento da percentagem de balonização hepatocitária às 48h no grupo Hx, comparativamente ao grupo Hx+LAE, que se torna gradualmente menos expressiva nos tempos seguintes, embora sem significância estatística.

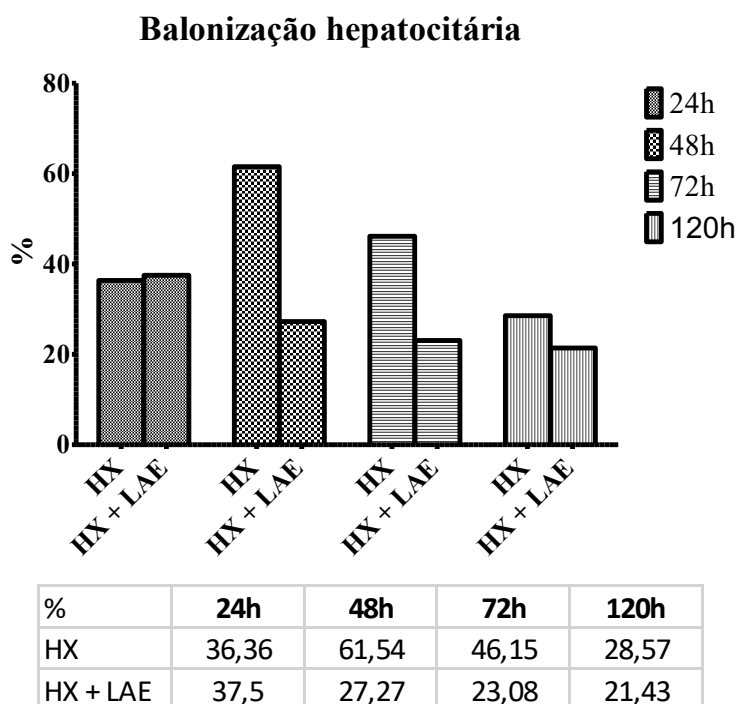


Figura 12 – Análise histológica da lesão tecidual: Balonização hepatocitária expressa em percentagem (%) para um número mínimo de 6 animais para cada subgrupo.

Verificou-se uma diminuição da percentagem de esteatose microvesicular em ambos os grupos às 120h, em relação às 24h ($p < 0,05$), conforme mostra a Figura 13.

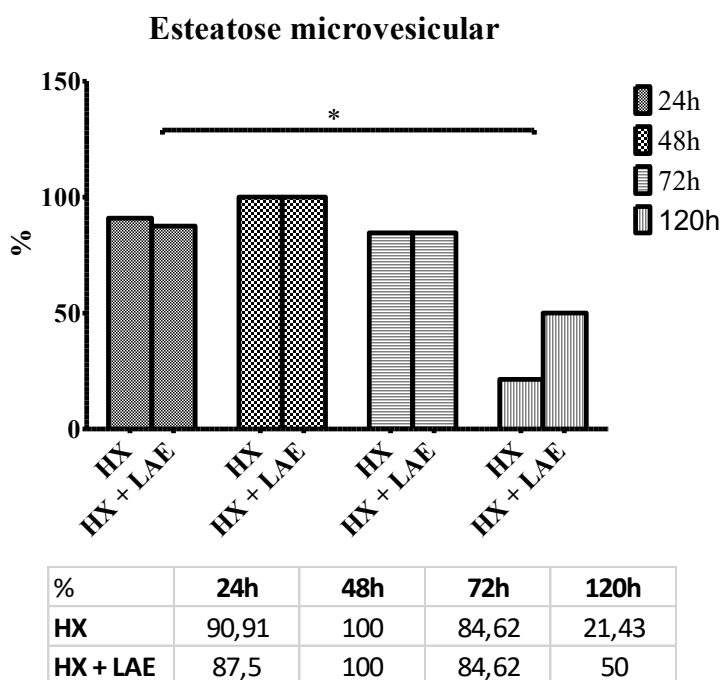
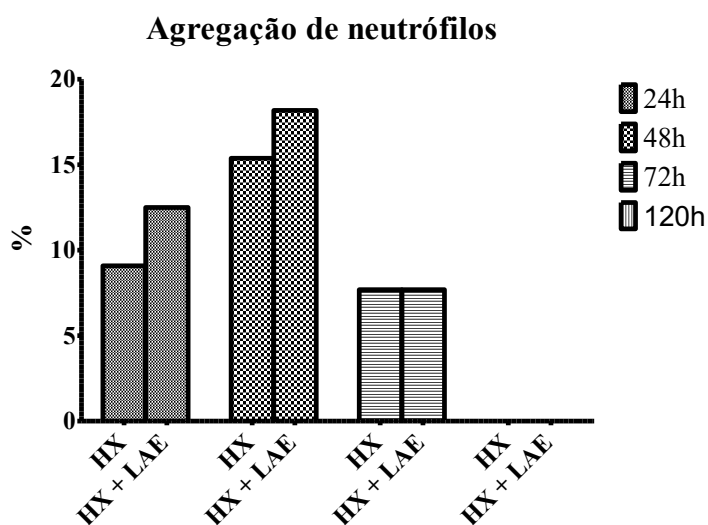


Figura 13 - Análise histológica da lesão tecidual: Esteatose microvesicular expressa em percentagem (%) para um número mínimo de 6 animais para cada subgrupo.

Analisando a percentagem de agregação de polimorfonucleares neutrófilos (Figura 14) e a percentagem estimada de necrose / apoptose hepatocitária (Figura 15), não se observou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Hx e Hx+LAE, nem ao longo do tempo de pós-operatório.



%	24h	48h	72h	120h
HX	9,09	15,38	7,69	0
HX + LAE	12,5	18,18	7,69	0

Figura 14 - Análise histológica da lesão tecidual: Agregação de polimorfonucleares neutrófilos expressa em percentagem (%) para um número mínimo de 6 animais para cada subgrupo.

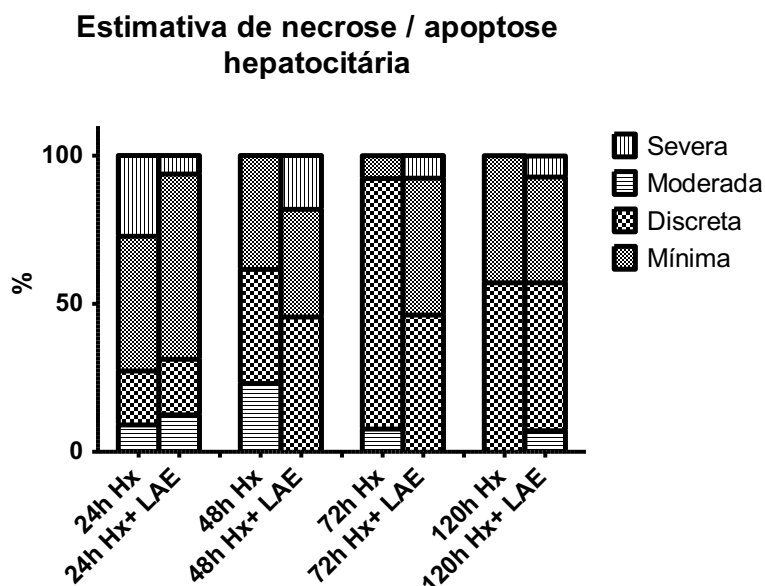


Figura 15 - Análise histológica da lesão tecidual: Estimativa da necrose / apoptose hepatocitária expressa em percentagem (%) para um número mínimo de 6 animais para cada subgrupo.

8.3.6.2. Regeneração hepatocitária

No que concerne à regeneração hepatocitária apresentam-se os resultados do índice mitótico e o índice proliferativo (através da expressão de Ki67).

Conforme ilustrado na Figura 16, observou-se um aumento do índice mitótico entre as 48h e as 72h, mais expressivo no grupo Hx+LAE ($p < 0,05$).

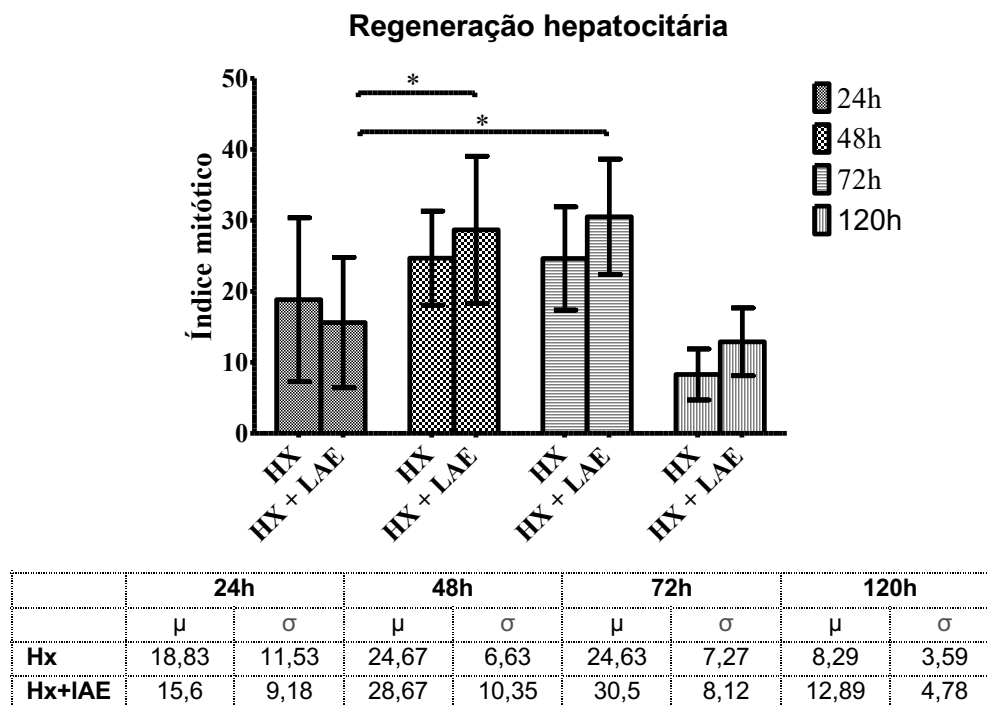


Figura 16 – Análise histológica da regeneração hepatocitária: Índice mitótico expresso em média de mitoses observadas em 10 campos de grande ampliação consecutivos $\pm$ desvio padrão.

Verifica-se uma tendência para a expressão aumentada de Ki67 entre as 48h e 72h, mais notória no grupo Hx+IAE, sem significado estatístico (Figura 17).

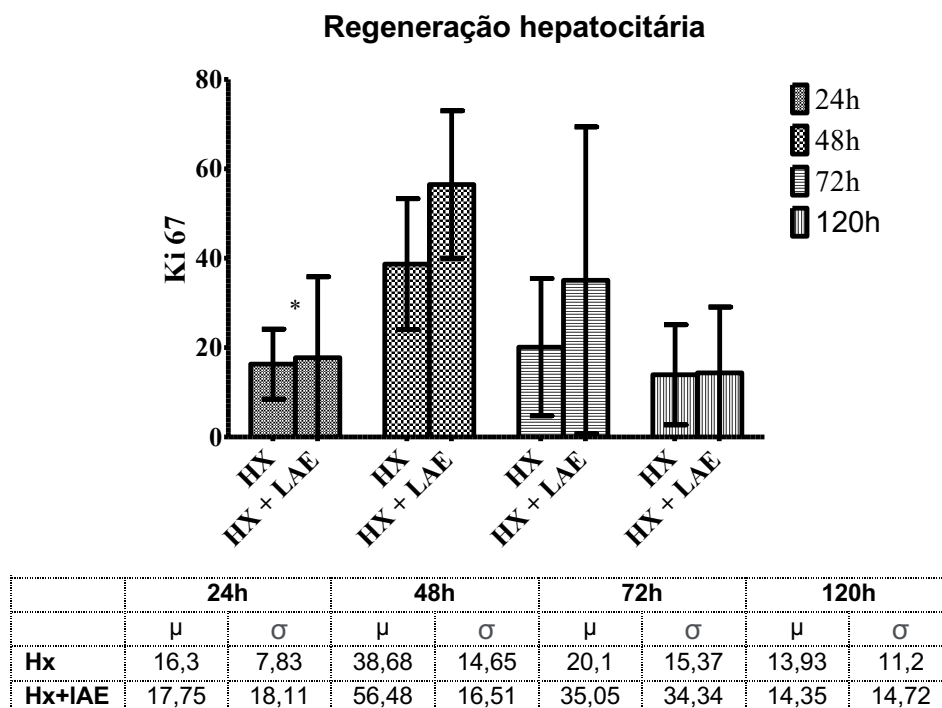


Figura 17 - Análise histológica da regeneração hepatocitária: Índice proliferativo avaliado pela expressão de Ki67 expresso em porcentagem de núcleos hepatocelulares positivos / 1000 hepatócitos $\pm$ desvio padrão.

8.4 Discussão

Os resultados demonstraram que a laqueação da artéria esplênica produz incremento significativo da viabilidade às 24h, que se mantém ao longo dos tempos seguintes, induzindo um decréscimo da acumulação intracelular de peróxidos e radical superóxido durante as primeiras 48h. Este procedimento permite também uma maior capacidade antioxidante às 24h, o que se reflecte numa diminuição do tempo de redução a metade de actividade máxima, obtido na curva de excreção normalizada, entre as 48h e 72h e num aumento do índice mitótico neste período. Estes resultados são corroborados por diversos estudos experimentais que incluem terapêuticas farmacológicas[77,83,88,165,166] e estratégias cirúrgicas [106,119,130] de modulação do influxo portal, os quais demonstraram um efeito mitigante no stresse oxidativo e um aumento da viabilidade hepatocitária.

Apesar de a LAE não produzir efeitos na fracção de extracção hepatocitária, induziu uma diminuição significativa do tempo de redução a metade de actividade máxima, obtido na curva de excreção normalizada, entre as 48h e 72h, para um nível de significância superior a 5%. Este insipiente aumento da depuração hepática pode ser explicado pela necessidade de um período superior a 5 dias para a recuperação da função hepática, conforme comprovado em estudos prévios [15].

Na análise histológica, poderemos concluir que a LAE, quando associada a hepatectomia major, não acarreta maior lesão hepatocitária; pelo contrário, tende a proteger o remanescente hepático da lesão induzida pela hepatectomia, apesar da ausência de significância estatística, o que é suportado por trabalhos prévios que demonstraram que a modulação do influxo portal atenua a lesão parenquimatosa induzida pela hepatectomia major [20,106]. O índice mitótico aumentou em ambos os grupos, entre as 48h e as 72h, de forma mais notória no grupo em que foi associada a LAE, demonstrando que esta manobra, ao modular o influxo portal, provoca um efeito positivo na regeneração hepática, tal como ficou demonstrado em estudos prévios [130,131]. A tendência para o aumento de expressão de Ki67, observada no mesmo período, mais notória no grupo submetido a LAE, corrobora esta conclusão. A ausência de significância estatística está provavelmente relacionada com a reduzida amostra nesta variável.

O incremento da viabilidade e regeneração observadas no grupo submetido a LAE é uma provável consequência da redução do stresse oxidativo nas primeiras 48h e do incremento da capacidade antioxidante hepatocitária observadas nas primeiras 24h.

A elevação inicial e o decréscimo tardio do potencial de membrana mitocondrial, poderá parecer incongruente com os restantes resultados. No entanto, o aumento do potencial de membrana mitocondrial, observado nas primeiras 48h, em comparação com grupo de controlo não hepatectomizado, pode ser explicado pelo incremento da proliferação celular observado neste período. O decréscimo do potencial de membrana mitocondrial verificado às 120h no grupo submetido a LAE, não está associado a morte celular, o que pode ser explicado pelo decréscimo nos níveis de factores de crescimento neste tempo pós-operatório.

Estes resultados biomoleculares, em linha com investigações experimentais prévias focadas na modulação do influxo portal [20,27,77,83,88,106,119,130,131,165,166], suporta o incremento de sobrevida e decréscimo da morbimortalidade observadas em estudos clínicos prévios [43,129].

8.5 Conclusão

A hepatectomia major, associada à laqueação da artéria esplénica, no modelo murino, permite a modulação do fluxo venoso portal, promovendo um aumento da viabilidade e regeneração hepáticas, sem comprometer a função, ao induzir um stresse oxidativo menos expressivo nas primeiras 48h.

9. Discussão geral

Nesta investigação, ficou evidenciada a importância da medição intra-operatória do incremento da PVP. O seu relativo aumento, face ao valor pré-hepatectomia, influencia a deterioração da função hepática no período pós-operatório e está associada à ocorrência de falência hepática após hepatectomia. Uma elevação da PVP ≥ 2 mm Hg após hepatectomia major, aumenta o risco de complicações pós-operatórias.

Os resultados obtidos, num estudo que incluiu diversos factores potencialmente influenciadores do *outcome*, contribuíram para standardizar a metodologia e para definir melhor os critérios para seleccionar os doentes que poderão beneficiar de uma estratégia moduladora do influxo portal.

A investigação no âmbito da modulação do influxo portal, através da laqueação da artéria esplénica, suporta o incremento da sobrevida e a redução da morbilidade observadas em estudos prévios. Foi comprovado que a laqueação da artéria esplénica, combinada com uma hepatectomia de 85%, no modelo murino, promove um incremento da viabilidade e regeneração hepatocelulares, sem comprometer a função hepática, por minimizar o stresse oxidativo nas primeiras 48 horas. Promover a modulação do influxo portal, através de uma manobra cirúrgica menos complexa, reprodutível e indutora de menor iatrogenia, como a laqueação da artéria esplénica, poderá permitir no futuro minimizar os efeitos deletérios da elevação da PVP após hepatectomia major e prevenir a SSFS no transplante de dador vivo, sem riscos significativos para o doente.

Investigação suplementar, através de estudos clínicos prospectivos e randomizados, será necessária, de forma a alargar os critérios de inclusão de ressecção hepática major ou de transplante hepático de dador vivo, permitindo oferecer um tratamento curativo a um maior número de doentes, sem acréscimo significativo de morbimortalidade.

10. Conclusão

O aumento da pressão venosa portal durante a hepatectomia, influencia a deterioração da função hepática no período pós-operatório. O incremento da PVP ≥ 2 mmHg, após hepatectomia major, aumenta o risco de morbimortalidade.

Este trabalho, não só demonstra a importância do cálculo do incremento da PVP durante a hepatectomia, como poderá influenciar a linha de investigação futura, contribuindo para a definição de indicações para efectuar uma manobra de modulação do influxo portal.

A laqueação da artéria esplénica durante a hepatectomia de 85%, no modelo murino, promove um aumento da viabilidade e regeneração hepatocelulares, sem comprometer a função hepática. Esta manobra cirúrgica moduladora do influxo portal, reproduzível e sem iatrogenia significativa, poderá promover investigação suplementar e permitir expandir os critérios clínicos de inclusão para tratamento curativo.

11. Bibliografia

- [1] Allard M-A, Adam R, Bucur P-O, Termos S, Cunha AS, Bismuth H, et al. Posthepatectomy portal vein pressure predicts liver failure and mortality after major liver resection on noncirrhotic liver. *Ann Surg* 2013;258:822–9; discussion 829-30. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3182a64b38>.
- [2] Elshamy M, Aucejo F, Menon KVN, Egtesad B. Hepatocellular carcinoma beyond Milan criteria: Management and transplant selection criteria. *World J Hepatol* 2016;8:874. <https://doi.org/10.4254/wjh.v8.i21.874>.
- [3] Belghiti J, Kianmanesh R. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)* 2005;7:42–9. <https://doi.org/10.1080/13651820410024067>.
- [4] Balzan S, Belghiti J, Farges O, Ogata S, Sauvanet A, Delefosse D, et al. The 50-50 Criteria on Postoperative Day 5. *Ann Surg* 2005;242:824–9. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000189131.90876.9e>.
- [5] Hernandez-Gea V, Turon F, Berzigotti A, Villanueva A. Management of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: focus on portal hypertension. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2013;19:1193–9. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i8.1193>.
- [6] Asencio JM, García Sabrido JL, Olmedilla L. How to expand the safe limits in hepatic resections? *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2014;21:399–404. <https://doi.org/10.1002/jhbp.97>.
- [7] Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, Regimbeau JM, Santoro R, Vilgrain V, et al. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. vol. 237. 2003. <https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000048447.16651.7B>.
- [8] Hanafy AS. Prediction and Prevention of Post-hepatectomy Liver Failure: Where Do We Stand? *J Clin Transl Hepatol* 2021;000:000–000. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00144>.
- [9] Wagener G. Assessment of hepatic function, operative candidacy, and medical management after liver resection in the patient with underlying liver disease. *Semin Liver Dis* 2013;33:204–12. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1351777>.
- [10] Goja S, Srivastava M, Singh M, Sinha R, Roy R, Mahabaleswar V, et al. Is Portal Inflow Modulation Always Necessary for Successful Utilization of Small Volume Living Donor Liver Grafts? *Liver Transplantation* 2020;26:304–5. <https://doi.org/10.1002/lt.25670>.
- [11] Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *The Lancet* 2008;371:838–51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60383-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60383-9).
- [12] Kamath P. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33:464–70. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22172>.

- [13] Søreide JA, Deshpande R. Post hepatectomy liver failure (PHLF) – Recent advances in prevention and clinical management. *European Journal of Surgical Oncology* 2021;47:216–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2020.09.001>.
- [14] Tralhao JG, Hoti E, Oliveiros B, Botelho MF, Sousa FC. Study of perioperative liver function by dynamic monitoring of ICG-clearance. *Hepatogastroenterology* 2012;59:1179–83. <https://doi.org/10.5754/hge09726>.
- [15] Tralhão JG, Abrantes AM, Hoti E, Oliveiros B, Cardoso D, Faitot F, et al. Hepatectomy and liver regeneration: from experimental research to clinical application. *ANZ J Surg* 2014;84:665–71. <https://doi.org/10.1111/ans.12201>.
- [16] Kloek JJ, Marsman HA, van Vliet AK, Gouma DJ, van Gulik TM. Biliary drainage attenuates postischemic reperfusion injury in the cholestatic rat liver. *Surgery* 2008;144:22–31. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2008.03.030>.
- [17] Smyrniotis V, Kostopanagiotou G, Theodoraki K, Tsantoulas D, Contis JC. The role of central venous pressure and type of vascular control in blood loss during major liver resections. *Am J Surg* 2004;187:398–402. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2003.12.001>.
- [18] Wang W-D, Liang L-J, Huang X-Q, Yin X-Y. Low central venous pressure reduces blood loss in hepatectomy. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2006;12:935–9.
- [19] Sugiyama Y, Ishizaki Y, Imamura H, Sugo H, Yoshimoto J, Kawasaki S. Effects of intermittent Pringle’s manoeuvre on cirrhotic compared with normal liver. *Br J Surg* 2010;97:1062–9. <https://doi.org/10.1002/bjs.7039>.
- [20] Asencio JM, Vaquero J, Olmedilla L, García Sabrido JL. “Small-for-flow” syndrome: shifting the “size” paradigm. *Med Hypotheses* 2013;80:573–7. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.01.028>.
- [21] Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:274–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x>.
- [22] Maor Y, Malnick S. Liver Injury Induced by Anticancer Chemotherapy and Radiation Therapy. *Int J Hepatol* 2013;2013:1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/815105>.
- [23] Tranchart H, Catherine L, Maitre S, Lainas P, De Laveaucoupet J, Dagher I. Efficient liver regeneration following temporary portal vein embolization with absorbable gelatin sponge powder in humans. *J Vasc Interv Radiol* 2015;26:507–15. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2014.11.033>.

- [24] Schindl MJ. The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection. *Gut* 2005;54:289–96. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.046524>.
- [25] Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, Brooke-Smith M, Crawford M, Adam R, et al. Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery* 2011;149:713–24. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2010.10.001>.
- [26] Chen X, Zhai J, Cai X, Zhang Y, Wei L, Shi L, et al. Severity of portal hypertension and prediction of postoperative liver failure after liver resection in patients with Child-Pugh grade A cirrhosis. *Br J Surg* 2012;99:1701–10. <https://doi.org/10.1002/bjs.8951>.
- [27] Hou P, Chen C, Tu Y-L, Zhu Z-M, Tan J-W. Extracorporeal continuous portal diversion plus temporal plasmapheresis for “small-for-size” syndrome. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2013;19:5464–72. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i33.5464>.
- [28] Ninomiya M, Shirabe K, Terashi T, Ijichi H, Yonemura Y, Harada N, et al. Deceleration of regenerative response improves the outcome of rat with massive hepatectomy. *American Journal of Transplantation* 2010;10:1580–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03150.x>.
- [29] Fondevila C, Hessheimer AJ, Taurá P, Sánchez O, Calatayud D, de Riva N, et al. Portal hyperperfusion: mechanism of injury and stimulus for regeneration in porcine small-for-size transplantation. *Liver Transpl* 2010;16:364–74. <https://doi.org/10.1002/lt.21989>.
- [30] Iida T, Yagi S, Taniguchi K, Hori T, Uemoto S. Improvement of morphological changes after 70% hepatectomy with portocaval shunt: preclinical study in porcine model. *J Surg Res* 2007;143:238–46. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.11.020>.
- [31] Orue-Echebarria MI, Lozano P, Olmedilla L, García Sabrido JL, Asencio JM. “Small-for-Flow” Syndrome: Concept Evolution. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2020;24:1386–91. <https://doi.org/10.1007/s11605-020-04576-9>.
- [32] Abdallah A, Salman AA, Sholkamy AA, Salman MA, Omar MG, Youssef A, et al. Study of factors affecting Small for Size Syndrome Post-Adult living donor liver transplantation. *Asian J Surg* 2021;44:452–8. <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2020.10.016>.
- [33] Kiuchi T, Kasahara M, Uryuhara K, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, et al. Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. *Transplantation* 1999;67:321–7.

- [34] Eshkenazy R, Dreznik Y, Lahat E, Zakai BB, Zendel A, Ariche A. Small for size liver remnant following resection: prevention and management. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;3:303–12. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.09.08>.
- [35] Golriz M, Majlesara A, El Sakka S, Ashrafi M, Arwin J, Fard N, et al. Small for Size and Flow (SFSF) syndrome: An alternative description for posthepatectomy liver failure. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2016;40:267–75. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2015.06.024>.
- [36] Jiang S-M, Zhou G-W, Zhang R, Peng C-H, Yan J-Q, Wan L, et al. Role of splanchnic hemodynamics in liver regeneration after living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2009;15:1043–9. <https://doi.org/10.1002/lt.21797>.
- [37] Hessheimer AJ, Fondevila C, Taurá P, Muñoz J, Sánchez O, Fuster J, et al. Decompression of the portal bed and twice-baseline portal inflow are necessary for the functional recovery of a “small-for-size” graft. *Ann Surg* 2011;253:1201–10. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181ffb2d7>.
- [38] Vasavada BB, Chen CL, Zakaria M. Portal flow is the main predictor of early graft dysfunction regardless of the GRWR status in living donor liver transplantation - a retrospective analysis of 134 patients. *Int J Surg* 2014;12:177–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijisu.2013.12.006>.
- [39] Riddiough GE, Christophi C, Jones RM, Muralidharan V, Perini M V. A systematic review of small for size syndrome after major hepatectomy and liver transplantation. *HPB* 2020;22:487–96. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2019.10.2445>.
- [40] Cucchetti A, Cescon M, Golfieri R, Piscaglia F, Renzulli M, Neri F, et al. Hepatic venous pressure gradient in the preoperative assessment of patients with resectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016;64:79–86. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.08.025>.
- [41] Berzigotti A, Reig M, Abraldes JG, Bosch J, Bruix J. Portal hypertension and the outcome of surgery for hepatocellular carcinoma in compensated cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 2015;61:526–36. <https://doi.org/10.1002/hep.27431>.
- [42] Yagi S, Iida T, Hori T, Taniguchi K, Yamamoto C, Yamagiwa K, et al. Optimal portal venous circulation for liver graft function after living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2006;81:373–8. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000198122.15235.a7>.
- [43] Kaido T, Mori A, Ogura Y, Hata K, Yoshizawa A, Iida T, et al. Lower limit of the graft-to-recipient weight ratio can be safely reduced to 0.6% in adult-to-adult living donor

- liver transplantation in combination with portal pressure control. *Transplant Proc* 2011;43:2391–3. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.05.037>.
- [44] Govil S, Reddy MS, Rela M. Has “Small-for-Size” Reached Its “Sell-By” Date. *Transplantation* 2016;100:e119. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001443>.
- [45] Bruix J, Castells A, Bosch J, Feu F, Fuster J, Garcia-Pagan JC, et al. Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure. *Gastroenterology* 1996;111:1018–22.
- [46] Santambrogio R, Kluger MD, Costa M, Belli A, Barabino M, Laurent A, et al. Hepatic resection for hepatocellular carcinoma in patients with Child-Pugh’s A cirrhosis: is clinical evidence of portal hypertension a contraindication? *HPB (Oxford)* 2013;15:78–84. <https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2012.00594.x>.
- [47] Hidaka M, Takatsuki M, Soyama A, Tanaka T, Muraoka I, Hara T, et al. Intraoperative portal venous pressure and long-term outcome after curative resection for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2012;99:1284–9. <https://doi.org/10.1002/bjs.8861>.
- [48] Gomes Carrapita JH, Margarida Abrantes A, Sousa-Pinto B, Nunes Santos J, Filomena Botelho M, Guilherme Tralhao J, et al. Portal Pressure Impact on Clinical Outcome after Major Hepatectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Surgery, Gastroenterology and Oncology* 2020;25:113. <https://doi.org/10.21614/sgo-25-3-113>.
- [49] Mortensen KE, Conley LN, Hedegaard J, Kalstad T, Sorensen P, Bendixen C, et al. Regenerative response in the pig liver remnant varies with the degree of resection and rise in portal pressure. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G819–30. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00179.2007>.
- [50] Leng J, Xing H, Tan J, Chen K, Dong J. The safe minimally ischemic liver remnant for small-for-size syndrome in porcine hepatectomy. *Transplant Proc* n.d.;45:2419–24. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.12.034>.
- [51] Imura S, Shimada M, Ikegami T, Morine Y, Kanemura H. Strategies for improving the outcomes of small-for-size grafts in adult-to-adult living-donor liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008;15:102–10. <https://doi.org/10.1007/s00534-007-1297-3>.
- [52] Boermeester MA, Houdijk APJ, Straatsburg IH, Noorden CJF van, Leeuwen PAM van. Organ blood flow after partial hepatectomy in rats: modification by endotoxin-neutralizing bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI23). *J Hepatol* 1999;31:905–12. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(99\)80293-1](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(99)80293-1).

- [53] Ohtake M, Sandoh N, Sakaguchi T, Tsukada K, Hatakeyama K. Enhancement of portal blood flow by ursodesoxycholic acid in partially hepatectomized rats. *Surg Today* 1996;26:142–4. <https://doi.org/10.1007/BF00311781>.
- [54] Nishimura A, Fujita N, Sakaguchi T, Aono T, Tsukada K, Hatakeyama K. Portal injection of dopamine directly increases portal venous blood flow in 66 percent hepatectomized rats. *Acta Medica et Biologica* 45(2): 75-79 1997.
- [55] Miñano C, Garcia-Tsao G. Clinical pharmacology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 2010;39:681–95. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2010.08.015>.
- [56] Villanueva C, Balanzó J. Variceal bleeding: pharmacological treatment and prophylactic strategies. *Drugs* 2008;68:2303–24.
- [57] Landa I, Arias J, Gómez M, Quadros M, Moreno A, Balibrea JL. Cytoprotective effect of somatostatin in a rat model of hepatic ischemic reperfusion. *Hepatology* 1992;16:1474–6.
- [58] Yamamoto K, Takenaka K, Matsumata T, Shimada M, Sugimachi K. The effect of octreotide on morphological hepatic regeneration and hepatic functional recovery after a two-thirds hepatectomy in rats. *Hepatogastroenterology* n.d.;46:1880–4.
- [59] Hashimoto M, Kothary PC, Raper SE. The effects of transforming growth factor alpha and somatostatin on regenerating hepatocytes in the rat. *Regul Pept* 1993;44:49–59.
- [60] Xu X, Man K, Zheng S, Sen, Liang TB, Lee TK, Ng KT, et al. Attenuation of acute phase shear stress by somatostatin improves small-for-size liver graft survival. *Liver Transpl* 2006;12:621–7. <https://doi.org/10.1002/lt.20630>.
- [61] Mohkam K, Darnis B, Schmitt Z, Duperret S, Ducerf C, Mabrut J-Y. Successful modulation of portal inflow by somatostatin in a porcine model of small-for-size syndrome. *Am J Surg* 2016;212:321–6. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2016.01.043>.
- [62] Du Z, Zhou Y, Lu X, Li L, Lu C, Li L, et al. Octreotide prevents liver failure through upregulating 5'-methylthioadenosine in extended hepatectomized rats. *Liver International* 2016;36:212–22. <https://doi.org/10.1111/liv.12863>.
- [63] Ozden I, Kara M, Pinarbasi B, Salmaslioglu A, Yavru A, Kaymakoglu S, et al. Somatostatin and propranolol to treat small-for-size syndrome that occurred despite splenic artery ligation. *Exp Clin Transplant* 2007;5:686–9.
- [64] Davies N, Yates J, Kynaston H, Taylor BA, Jenkins SA. Effects of octreotide on liver regeneration and tumour growth in the regenerating liver. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:47-53nd development of hepatic tumour in rats, we.

- [65] Tsukada K, Katoh H, Iga Y, Tomiyama T, Okamura N, Sugimoto F, et al. Prostaglandin E1 enhances hepatic portal venous flow by dilating the portal vascular bed in 70% hepatectomized dog. *Gastroenterol Jpn* 1992;27:341–7. <https://doi.org/10.1007/BF02777752>.
- [66] Nakadaira K, Tsukada K, Sakaguchi T, Shirai Y, Kurosaki I, Ohtake M, et al. A pharmacological analysis of prostaglandin E1 on portal blood flow after partial hepatectomy in rats. *Surg Today* 1993;23:277–9. <https://doi.org/10.1007/BF00309242>.
- [67] ISHIDUKA D, AONO T, SAKAGUCHI T, TSUKADA K, HATAKEYAMA K. Characteristic Responses in Portal Venous Blood Flow Caused by Omental Administration of Prostaglandin E1 in 66% Hepatectomized Rats. *Acta Medica et Biologica* 1995;Vol. 43:143–5.
- [68] Aono T, Sakaguchi T, Fujita N, Shimizu T, Tsukada K, Hatakeyama K. Omental delivery of prostaglandin E1 effectively increases portal venous blood flow in 66%-hepatectomized rats. *Surg Today* 1997;27:473–6. <https://doi.org/10.1007/BF02385718>.
- [69] Hossain MA, Hamamoto I, Kobayashi S, Maeba T, Maeta H. The effects of intraportal administration of prostaglandin E 1 on liver ischemia and hepatectomy in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998;5:437–44. <https://doi.org/10.1007/s005340050069>.
- [70] Matsuo K, Togo S, Sekido H, Morita T, Kamiyama M, Morioka D, et al. Pharmacologic preconditioning effects: prostaglandin E1 induces heat-shock proteins immediately after ischemia/reperfusion of the mouse liver. *J Gastrointest Surg* n.d.;9:758–68. <https://doi.org/10.1016/j.gassur.2005.02.004>.
- [71] Li J, Wang Y, Huang Y, Li H, Chen W, Yang J. [Experimental study of protective mechanism of Lipo-PGE(1) on hepatic ischemia-reperfusion injury]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2009;89:3371–4.
- [72] Yoshida N, Iwata H, Yamada T, Sekino T, Matsuo H, Shirahashi K, et al. Improvement of the survival rate after rat massive hepatectomy due to the reduction of apoptosis by caspase inhibitor. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:2015–21. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04960.x>.
- [73] Ishibe A, Togo S, Kumamoto T, Watanabe K, Takahashi T, Shimizu T, et al. Prostaglandin E1 prevents liver failure after excessive hepatectomy in the rat by up-regulating Cyclin C, Cyclin D1, and Bclxl. *Wound Repair Regen* n.d.;17:62–70. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00442.x>.

- [74] Ando K, Miyazaki M, Shimizu H, Okuno A, Nakajima N. Beneficial effects of prostaglandin E(1) incorporated in lipid microspheres on liver injury and regeneration after 90% partial hepatectomy in rats. *Eur Surg Res* 2000;32:155–61. <https://doi.org/8757>.
- [75] Togo S, Chen H, Takahashi T, Kubota T, Matsuo K, Morioka D, et al. Prostaglandin E1 improves survival rate after 95% hepatectomy in rats. *J Surg Res* 2008;146:66–72. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.05.003>.
- [76] Suehiro T, Shimada M, Kishikawa K, Shimura T, Soejima Y, Yoshizumi T, et al. Effect of intraportal infusion to improve small for size graft injury in living donor adult liver transplantation. *Transpl Int* 2005;18:923–8. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2005.00159.x>.
- [77] Jia C, Dai C, Bu X, Peng S, Xu F, Xu Y, et al. Co-administration of prostaglandin E1 with somatostatin attenuates acute liver damage after massive hepatectomy in rats via inhibition of inflammatory responses, apoptosis and endoplasmic reticulum stress. *Int J Mol Med* 2013;31:416–22. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1213>.
- [78] Sun H, Chen L, Zhou W, Hu L, Li L, Tu Q, et al. The protective role of hydrogen-rich saline in experimental liver injury in mice. *J Hepatol* 2011;54:471–80. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.08.011>.
- [79] Kaizu T, Nakao A, Tsung A, Toyokawa H, Sahai R, Geller DA, et al. Carbon monoxide inhalation ameliorates cold ischemia/reperfusion injury after rat liver transplantation. *Surgery* 2005;138:229–35. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2005.06.015>.
- [80] Kaizu T, Ikeda A, Nakao A, Tsung A, Toyokawa H, Ueki S, et al. Protection of transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury with carbon monoxide via MEK/ERK1/2 pathway downregulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G236–44. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00144.2007>.
- [81] Nakao A, Neto JS, Kanno S, Stolz DB, Kimizuka K, Liu F, et al. Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant* 2005;5:282–91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00695.x>.
- [82] Cantré D, Schuett H, Hildebrandt A, Dold S, Menger MD, Vollmar B, et al. Nitric oxide reduces organ injury and enhances regeneration of reduced-size livers by increasing hepatic arterial flow. *Br J Surg* 2008;95:785–92. <https://doi.org/10.1002/bjs.6139>.
- [83] Xiang L, Tan J-W, Huang L-J, Jia L, Liu Y-Q, Zhao Y-Q, et al. Inhalation of hydrogen gas reduces liver injury during major hepatotectomy in swine. *World Journal of Gastroenterology* : WJG 2012;18:5197–204. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i37.5197>.

- [84] Iguchi K, Hatano E, Yamanaka K, Sato M, Yamamoto G, Kasai Y, et al. Hepatoprotective effect by pretreatment with olprinone in a swine partial hepatectomy model. *Liver Transplantation* 2014;20:838–49. <https://doi.org/10.1002/lt.23884>.
- [85] Yamanaka K, Hatano E, Narita M, Kitamura K, Yanagida A, Asechi H, et al. Olprinone attenuates excessive shear stress through up-regulation of endothelial nitric oxide synthase in a rat excessive hepatectomy model. *Liver Transpl* 2011;17:60–9. <https://doi.org/10.1002/lt.22189>.
- [86] Yamanaka K, Hatano E, Iguchi K, Yamamoto G, Sato M, Toriguchi K, et al. Effect of olprinone on liver microstructure in rat partial liver transplantation. *J Surg Res* 2013;183:391–6. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.11.033>.
- [87] von Heesen M, Dold S, Müller S, Scheuer C, Kollmar O, Schilling MK, et al. Cilostazol improves hepatic blood perfusion, microcirculation, and liver regeneration after major hepatectomy in rats. *Liver Transplantation* 2015;21:792–800. <https://doi.org/10.1002/lt.24114>.
- [88] Ren Z, Xu Y, Zhu S. The effect of terlipressin on hepatic hemodynamics in small-for-size livers. *Hepatogastroenterology* n.d.;59:208–11. <https://doi.org/10.5754/hge11288>.
- [89] Fahrner R, Patsenker E, de Gottardi A, Stickel F, Montani M, Stroka D, et al. Elevated liver regeneration in response to pharmacological reduction of elevated portal venous pressure by terlipressin after partial hepatectomy. *Transplantation* 2014;97:892–900. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000045>.
- [90] Jo H-S, Han JH, Choi YY, Seok J-I, Yoon Y-I, Kim D-S. The beneficial impacts of splanchnic vasoactive agents on hepatic functional recovery in massive hepatectomy porcine model. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2021;10:325–36. <https://doi.org/10.21037/hbsn.2019.11.31>.
- [91] Fahrner R, Patsenker E, de Gottardi A, Stickel F, Montani M, Stroka D, et al. Elevated liver regeneration in response to pharmacological reduction of elevated portal venous pressure by terlipressin after partial hepatectomy. *Transplantation* 2014;97:892–900. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000045>.
- [92] Jo H-S, Park H-J, Choi YY, Seok J-I, Han J-H, Yoon Y-I, et al. Portal modulation effects of terlipressin on liver regeneration and survival in a porcine model subjected to 90% hepatectomy. *Am J Transl Res* 2021;13:5880–91.
- [93] Sánchez-Cabús S, Fondevila C, Calatayud D, Ferrer J, Taurá P, Fuster J, et al. Importance of the temporary portocaval shunt during adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2013;19:174–83. <https://doi.org/10.1002/lt.23558>.

- [94] Kantola T, Koivusalo A-M, Höckerstedt K, Isoniemi H. The effect of molecular adsorbent recirculating system treatment on survival, native liver recovery, and need for liver transplantation in acute liver failure patients. *Transpl Int* 2008;21:857–66. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2008.00698.x>.
- [95] van de Kerkhove M-P, de Jong KP, Rijken AM, de Pont A-CJM, van Gulik TM. MARS treatment in posthepatectomy liver failure. *Liver Int* 2003;23 Suppl 3:44–51.
- [96] Kjaergard LL, Liu J, Als-Nielsen B, Gluud C. Artificial and bioartificial support systems for acute and acute-on-chronic liver failure: a systematic review. *JAMA* 2003;289:217–22.
- [97] Kawano Y, Akimaru K, Takubo K, Matsumoto K, Yoshida H, Mamada Y, et al. Jejunectomy Can Reduce Excessively Elevated Portal Pressure After Major Hepatectomy in Beagle Dogs. *Journal of Surgical Research* 2006;130:24–33. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.08.019>.
- [98] Ueno S, Kobayashi Y, Kurita K, Tanabe G, Aikou T. Effect of prior portosystemic shunt on early hepatic hemodynamics and sinusoids following 84% hepatectomy in dogs. *Research in Experimental Medicine* 1995;195:1–8. <https://doi.org/10.1007/BF02576768>.
- [99] Fukuchi T, Hirose H, Onitsuka A, Hayashi M, Senga S, Imai N, et al. Effects of Portal–Systemic Shunt Following 90% Partial Hepatectomy in Rats. *Journal of Surgical Research* 2000;89:126–31. <https://doi.org/10.1006/jsre.1999.5810>.
- [100] Hayashi H, Shimizu K, Tani T, Takamura H, Takeshita M, Nakamura K, et al. Effect of porto-systemic shunting on NOS expression after extended hepatectomy in rats. *Hepatology Research* 2009;39:78–85. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2008.00404.x>.
- [101] Guest J, Ryan CJ, Benjamin IS, Blumgart LH. Portacaval transposition and subsequent partial hepatectomy in the rat: effects on liver atrophy, hypertrophy and regenerative hyperplasia. *Br J Exp Pathol* 1977;58(2):140–6.
- [102] Sato Y, Koyama S, Tsukada K, Hatakeyama K. Acute portal hypertension reflecting shear stress as a trigger of liver regeneration following partial hepatectomy. *Surg Today* 1997;27:518–26. <https://doi.org/10.1007/BF02385805>.
- [103] Mitsumoto Y, Dhar DK, Yu L, Soda Y, Kinugasa S, Kohno H, et al. FK506 with Portal Decompression Exerts Beneficial Effects following Extended Hepatectomy in Dogs. *European Surgical Research* 1999;31:48–56. <https://doi.org/10.1159/000008620>.
- [104] Wang H, Ohkohchi N, Enomoto Y, Usuda M, Miyagi S, Masuoka H, et al. Effect of Portocaval Shunt on Residual Extreme Small Liver after Extended Hepatectomy in

- Porcine. *World J Surg* 2006;30:2014–22. <https://doi.org/10.1007/s00268-005-0294-4>.
- [105] Hammond JS, Godtliebsen F, Steigen S, Guha IN, Wyatt J, Revhaug A, et al. The effects of terlipressin and direct portacaval shunting on liver hemodynamics following 80% hepatectomy in the pig. *Clin Sci* 2019;133:153–66. <https://doi.org/10.1042/CS20180858>.
- [106] Tu Y-L, Wang X, Wang D-D, Zhu Z-M, Tan J-W. Impact of mesocaval shunt on safe minimal liver remnant: porcine model. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2013;19:5076–84. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i31.5076>.
- [107] Botha JF, Langanas AN, Campos BD, Grant WJ, Freise CE, Ascher NL, et al. Left lobe adult-to-adult living donor liver transplantation: small grafts and hemiportocaval shunts in the prevention of small-for-size syndrome. *Liver Transpl* 2010;16:649–57. <https://doi.org/10.1002/lt.22043>.
- [108] Ishizaki Y, Kawasaki S, Sugo H, Yoshimoto J, Fujiwara N, Imamura H. Left lobe adult-to-adult living donor liver transplantation: Should portal inflow modulation be added? *Liver Transpl* 2012;18:305–14. <https://doi.org/10.1002/lt.22440>.
- [109] Li J, Liang L, Ma T, Yu X, Chen W, Xu G, et al. Sinusoidal microcirculatory changes after small-for-size liver transplantation in rats. *Transpl Int* 2010;23:924–33. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2010.01058.x>.
- [110] Marubashi S, Sakon M, Nagano H, Gotoh K, Hashimoto K, Kubota M, et al. Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model. *Surgery* 2004;136:1028–37. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2004.03.012>.
- [111] Schleimer K, Stippel DL, Kasper HU, Prenzel K, Gaudig C, Tawadros S, et al. Portal Vein Arterialization Increases Hepatocellular Apoptosis and Inhibits Liver Regeneration. *Journal of Surgical Research* 2008;149:250–8. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.01.021>.
- [112] Wang D-D, Xu Y, Zhu Z-M, Tan X-L, Tu Y-L, Han M-M, et al. Should temporary extracorporeal continuous portal diversion replace meso/porta-caval shunts in “small-for-size” syndrome in porcine hepatectomy? *World J Gastroenterol* 2015;21:888. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i3.888>.
- [113] González-Pinto IM, Miyar A, García-Bernardo C, Vázquez L, Barneo L, Cortés E, et al. Portoumbilical anastomosis as a simple method of transient portosystemic shunt during liver transplantation. *Transplant Proc* 2009;41:996–7. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.02.049>.

- [114] Doğrul AB, Yankol Y, Mecit N, Çimşit B, Kanmaz T, Acarlı K, et al. Preservation of the patent umbilical vein during a recipient hepatectomy: case report. *Exp Clin Transplant* 2014;12:484–6. <https://doi.org/10.6002/ect.2013.0174>.
- [115] Asencio JM, García-Sabrido JL, López-Baena JA, Olmedilla L, Peligros I, Lozano P, et al. Preconditioning by portal vein embolization modulates hepatic hemodynamics and improves liver function in pigs with extended hepatectomy. *Surgery* 2017;161:1489–501. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.12.003>.
- [116] Bucur PO, Bekheit M, Audebert C, Othman A, Hammad S, Sebah M, et al. Modulating Portal Hemodynamics With Vascular Ring Allows Efficient Regeneration After Partial Hepatectomy in a Porcine Model. *Ann Surg* 2018;268:134–42. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002146>.
- [117] Jin W, Wang B, Zhang Y, Dong R, Wang X, Guo J, et al. Effects of hepatic blood inflow on liver ultrastructure and regeneration after extensive liver resection in rats with cirrhosis. *Exp Ther Med* 2018. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6467>.
- [118] Arakawa Y, Shimada M, Uchiyama H, Ikegami T, Yoshizumi T, Imura S, et al. Beneficial effects of splenectomy on massive hepatectomy model in rats. *Hepatol Res* 2009;39:391–7. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2008.00469.x>.
- [119] Eipel C, Abshagen K, Ritter J, Cantré D, Menger MD, Vollmar B. Splenectomy improves survival by increasing arterial blood supply in a rat model of reduced-size liver. *Transpl Int* 2010;23:998–1007. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2010.01079.x>.
- [120] Glanemann M, Eipel C, Nussler AK, Vollmar B, Neuhaus P. Hyperperfusion Syndrome in Small-for-Size Livers. *European Surgical Research* 2005;37:335–41. <https://doi.org/10.1159/000090333>.
- [121] Nasr MM, Hassan AMA, Elsebaie SB, Elsebae MA, Nosseir MMF. Effect of splenectomy on liver regeneration and function following partial hepatectomy: experimental study. *J Egypt Soc Parasitol* 2011;41:601–10.
- [122] Athanasiou A, Papalois A, Kontos M, Griniatsos J, Liakopoulos D, Spartalis E, et al. The beneficial role of simultaneous splenectomy after extended hepatectomy: experimental study in pigs. *Journal of Surgical Research* 2017;208:121–31. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.09.002>.
- [123] Arlt J, Wei W, Xie C, Homeyer A, Settmacher U, Dahmen U, et al. Modulation of hepatic perfusion did not improve recovery from hepatic outflow obstruction. *BMC Pharmacol Toxicol* 2017;18:50. <https://doi.org/10.1186/s40360-017-0155-4>.
- [124] Ulmer TF, Weiland A, Lurje G, Klink C, Andert A, Alizai H, et al. Comparative study of the effects of terlipressin versus splenectomy on liver regeneration after partial

- hepatectomy in rats. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 2017;16:506–11. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(17\)60036-5](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(17)60036-5).
- [125] Yoshizumi T, Taketomi A, Soejima Y, Ikegami T, Uchiyama H, Kayashima H, et al. The beneficial role of simultaneous splenectomy in living donor liver transplantation in patients with small-for-size graft. *Transpl Int* 2008;21:833–42. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2008.00678.x>.
- [126] Neumann UP, Langrehr JM, Kaisers U, Lang M, Schmitz V, Neuhaus P. Simultaneous splenectomy increases risk for opportunistic pneumonia in patients after liver transplantation. *Transpl Int* 2002;15:226–32. <https://doi.org/10.1007/s00147-002-0399-8>.
- [127] Jeng L-B, Lee C-C, Chiang H-C, Chen T-H, Hsu C-H, Cheng H-T, et al. Indication for splenectomy in the era of living-donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2008;40:2531–3. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.07.016>.
- [128] Lo C-M, Liu C-L, Fan S-T. Portal hyperperfusion injury as the cause of primary nonfunction in a small-for-size liver graft-successful treatment with splenic artery ligation. *Liver Transpl* 2003;9:626–8. <https://doi.org/10.1053/jlts.2003.50081>.
- [129] Umeda Y, Yagi T, Sadamori H, Matsukawa H, Matsuda H, Shinoura S, et al. Effects of prophylactic splenic artery modulation on portal overperfusion and liver regeneration in small-for-size graft. *Transplantation* 2008;86:673–80. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318181e02d>.
- [130] Irie T, Ito K, Ozasa H, Noda Y, Ikeda S, Tanaka S, et al. Splenic artery ligation: A protection against hepatic ischemia/reperfusion injury in partially hepatectomized rats. *Hepatol Res* 2012;42:819–27. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2012.00989.x>.
- [131] Ito K, Ozasa H, Noda Y, Koike Y, Arai S, Horikawa S. Splenic artery ligation improves remnant liver function in partially hepatectomized rats with ischemia/reperfusion injury. *Liver Int* 2007;27:400–7. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01432.x>.
- [132] Darnis B, Mohkam K, Schmitt Z, Ledochowski S, Vial J-P, Duperret S, et al. Subtotal hepatectomy in swine for studying small-for-size syndrome and portal inflow modulation: is it reliable? *HPB* 2015;17:881–8. <https://doi.org/10.1111/hpb.12434>.
- [133] Duan Y-F, Li X-D, Sun D-L, Chen X-M, An Y, Zhu F. A preliminary study on surgery for hepatocellular carcinoma patients with portal hypertension. *The American Journal of Surgery* 2015;210:129–33. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2014.08.022>.
- [134] Hidaka M, Takatsuki M, Soyama A, Tanaka T, Muraoka I, Hara T, et al. Intraoperative portal venous pressure and long-term outcome after curative resection for

- hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2012;99:1284–9. <https://doi.org/10.1002/bjs.8861>.
- [135] Carrapita J, Abrantes AM, Campelos S, Gonçalves AC, Cardoso D, Sarmento-Ribeiro AB, et al. Impact of splenic artery ligation after major hepatectomy on liver function, regeneration and viability. *Sci Rep* 2016;6:34731. <https://doi.org/10.1038/srep34731>.
- [136] Lodewick TM, Arnoldussen CWKP, Lahaye MJ, van Mierlo KMC, Neumann UP, Beets-Tan RG, et al. Fast and accurate liver volumetry prior to hepatectomy. *HPB* 2016;18:764–72. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2016.06.009>.
- [137] Bismuth H, Houssin D, Castaing D. Major and minor segmentectomies “réglées” in liver surgery. *World J Surg* 1982;6:10–24. <https://doi.org/10.1007/BF01656369>.
- [138] Dindo D, Demartines N, Clavien P-A. Classification of Surgical Complications. *Ann Surg* 2004;240:205–13. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000133083.54934.ae>.
- [139] Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, Brooke-Smith M, Crawford M, Adam R, et al. Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery* 2011;149:713–24. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2010.10.001>.
- [140] Péus D, Newcomb N, Hofer S. Appraisal of the Karnofsky Performance Status and proposal of a simple algorithmic system for its evaluation. *BMC Med Inform Decis Mak* 2013;13:72. <https://doi.org/10.1186/1472-6947-13-72>.
- [141] Berzigotti A, Reig M, Abraldes JG, Bosch J, Bruix J. Portal hypertension and the outcome of surgery for hepatocellular carcinoma in compensated cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 2015;61:526–36. <https://doi.org/10.1002/hep.27431>.
- [142] Chen X, Zhai J, Cai X, Zhang Y, Wei L, Shi L, et al. Severity of portal hypertension and prediction of postoperative liver failure after liver resection in patients with Child-Pugh grade A cirrhosis. *Br J Surg* 2012;99:1701–10. <https://doi.org/10.1002/bjs.8951>.
- [143] Hidaka M, Takatsuki M, Soyama A, Tanaka T, Muraoka I, Hara T, et al. Intraoperative portal venous pressure and long-term outcome after curative resection for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2012;99:1284–9. <https://doi.org/10.1002/bjs.8861>.
- [144] Leng J, Xing H, Tan J, Chen K, Dong J. The safe minimally ischemic liver remnant for small-for-size syndrome in porcine hepatectomy. *Transplant Proc* n.d.;45:2419–24. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.12.034>.

- [145] Eshkenazy R, Dreznik Y, Lahat E, Zakai BB, Zendel A, Ariche A. Small for size liver remnant following resection: prevention and management. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;3:303–12. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.09.08>.
- [146] Ito T, Kiuchi T, Yamamoto H, Oike F, Ogura Y, Fujimoto Y, et al. Changes in portal venous pressure in the early phase after living donor liver transplantation: pathogenesis and clinical implications. *Transplantation* 2003;75:1313–7. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000063707.90525.10>.
- [147] Mortensen KE, Conley LN, Hedegaard J, Kalstad T, Sorensen P, Bendixen C, et al. Regenerative response in the pig liver remnant varies with the degree of resection and rise in portal pressure. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G819-30. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00179.2007>.
- [148] Carrapita JG, Rocha C, Donato H, Costa A, Abrantes AM, Santos JN, et al. Portal venous pressure variation during hepatectomy: A prospective study. *Acta Med Port* 2019;32. <https://doi.org/10.20344/amp.10892>.
- [149] Tralhão JG, Abrantes AM, Gonçalves AC, Hoti E, Laranjo M, Martins R, et al. Study of hepatocellular function in the murine model following hepatic artery selective clamping. *Acta Cirúrgica Brasileira / Sociedade Brasileira Para Desenvolvimento Pesquisa Em Cirurgia* 2013;28:657–63. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502013000900006>.
- [150] Tralhao JG, Roudier J, Morosan S, Giannini C, Tu H, Goulenok C, et al. Paracrine in vivo inhibitory effects of hepatitis B virus X protein (HBx) on liver cell proliferation: an alternative mechanism of HBx-related pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6991–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.092657699>.
- [151] GUGUENGUILLOUZO C, CLEMENT B, BAFFET G, BEAUMONT C, MORELCHANY E, GLAISE D, et al. Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp Cell Res* 1983;143:47–54. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(83\)90107-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(83)90107-6).
- [152] Mamede AC, Pires AS, Abrantes AM, Tavares SD, Gonçalves AC, Casalta-Lopes JE, et al. Cytotoxicity of ascorbic acid in a human colorectal adenocarcinoma cell line (WiDr): in vitro and in vivo studies. *Nutr Cancer* 2012;64:1049–57. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.713539>.
- [153] Dourado M, Sarmiento AB, Pereira SV, Alves V, Silva T, Pinto AM, et al. CD26/DPPIV expression and 8-azaguanine response in T-acute lymphoblastic leukaemia cell lines in culture. *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology* / *ISP* 2007;14:3–10. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2006.09.003>.

- [154] Almeida S, Sarmento-Ribeiro AB, Januário C, Rego a C, Oliveira CR. Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374:599–603. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.009>.
- [155] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142:231–55. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>.
- [156] Formentini L, Sánchez-Aragó M, Sánchez-Cenizo L, Cuezva JM. The Mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 Triggers a ROS-Mediated Retrograde Prosurvival and Proliferative Response. *Mol Cell* 2012;45:731–42. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.008>.
- [157] Gottlieb E, Armour SM, Harris MH, Thompson CB. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003;10:709–17. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401231>.
- [158] Davenport HA. Book Review. *Biotechnic & Histochemistry* 1966;41:71–71. <https://doi.org/10.3109/10520296609116283>.
- [159] Tsutsumi Y, Serizawa A, Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen: application to intra-operative frozen diagnosis. *Pathol Int* 1995;45:108–15.
- [160] Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver biopsy. *Hepatology* 2009;49:1017–44. <https://doi.org/10.1002/hep.22742>.
- [161] Serafín A, Fernández-Zabalegui L, Prats N, Wu ZY, Roselló-Catafau J, Peralta C. Ischemic preconditioning: tolerance to hepatic ischemia-reperfusion injury. *Histol Histopathol* 2004;19:281–9.
- [162] Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2007;47:598–607. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.07.006>.
- [163] Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 2000;31:241–6. <https://doi.org/10.1002/hep.510310136>.
- [164] Gerlach C, Sakkab DY, Scholzen T, Dassler R, Alison MR, Gerdes J. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 1997;26:573–8. <https://doi.org/10.1002/hep.510260307>.
- [165] Man K, Lee TK, Liang TB, Lo CM, Fung PC-W, Tsui SH, et al. FK 409 Ameliorates Small-for-Size Liver Graft Injury by Attenuation of Portal Hypertension and Down-

Regulation of Egr-1 Pathway. *Ann Surg* 2004;240:159–68.
<https://doi.org/10.1097/01.sla.0000129673.13552.c0>.

- [166] Zhao Y, Man K, Lo CM, Ng KT, Li XL, Sun CK, et al. Attenuation of small-for-size liver graft injury by FTY720: significance of cell-survival Akt signaling pathway. *Am J Transplant* 2004;4:1399–407. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00527.x>.

12. Anexos

ANEXO I [2]

Expanded morphometric criteria for hepatocellular carcinoma-liver transplantation

Table 1 Expanded morphometric criteria for hepatocellular carcinoma-liver transplantation

Ref.	Year	Description	Donor type	n	Survival
Yao <i>et al</i> ^[13]	2001	1 lesion ≤ 6.5 cm, or 2-3 lesions ≤ 4.5 cm each. Total tumor diameter ≤ 8 cm	Cadaveric	70	5 yr OS: 72.4%
Herrero <i>et al</i> ^[16]	2001	1 lesion ≤ 6 cm, or 2-3 lesions ≤ 5 cm each	Cadaveric	47	5 yr OS: 79%
Roayaie <i>et al</i> ^[19]	2002	Any number of lesions, 5-7 cm each	Cadaveric	43	5 yr RFS: 55%
Keneteman <i>et al</i> ^[20]	2004	1 lesion < 7.5 cm, or multiple lesions < 5 cm each	Cadaveric	40	4 yr OS: 82.9% 4 yr RFS: 76.8%
Onaca <i>et al</i> ^[18]	2007	1 lesion ≤ 6 cm, or 2-4 lesions ≤ 5 cm each	Cadaveric	120 6	5 yr RFS: 1 lesion ≤ 6 cm: 63.9%/or 2-4 lesions 3.1 cm-5 cm each: 64.6%
Soejima <i>et al</i> ^[23]	2007	Any number lesions ≤ 5 cm each	Living	67	3 yr OS: 68.6%
Jonas <i>et al</i> ^[24]	2007	Single lesion and diameter, or any number of lesions ≤ 6 cm each. Total tumor diameter ≤ 15 cm	Living	21	3 yr OS: 53%
Sugawara <i>et al</i> ^[25]	2007	Up to 5 lesions ≤ 5 cm each	Living	78	3 yr RFS: 94%
Silva <i>et al</i> ^[17]	2008	1-3 lesions ≤ 5 cm each. Total tumor diameter ≤ 10 cm	Cadaveric	25 7	5 yr OS: 67%
Mazzaferro <i>et al</i> ^[21]	2009	The sum of the size and number of tumors not exceeding 7 in the absence of microvascular invasion	Both	155 6	5 yr OS: 71.2%

RFS: Recurrence free survival; OS: Overall survival.

Anexo II [12] - Child Pugh Turcotte (CPT) classification

POINTS	1	2	3
Encephalopathy	absent	medically controlled	poorly controlled
Ascites	absent	controlled medically	poorly controlled
Bilirubin (mg/dL)	< 2	2-3	> 3
Albumin (g/dL)	< 3.5	2.8	< 2.8
		-	
INR	< 1.7	3.5	> 2.2
		1.7	
		-	
		2.2	
	CPT A: 5-6 POINTS	CPT B: 7-9 POINTS	CPT C: 10-15 POINTS
Life expectancy (years)	15-20	4-14	1-3
Perioperative mortality (abdominal surgery) (%)	10	30	80

INR, international i ratio.

Anexo III

ESCALA MELD

A escala MELD ou **Modelo para Doença Hepática Terminal**, do inglês *Model for End-Stage Liver Disease*, é um sistema de pontuação para avaliar a gravidade da doença hepática crônica.

Ela utiliza os valores do paciente de bilirrubina sérica, creatinina sérica e índice internacional normalizado (INR) para prever a sobrevida. Este sistema também é utilizado para priorizar a alocação dos pacientes para transplantes hepáticos.

É calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{MELD} = 3,78[\text{Ln bilirrubina sérica (mg/dL)}] + 11,2[\text{Ln INR}] + 9,57[\text{Ln creatinina sérica (mg/dL)}] + 6,43$$

Obs: Ln = Logaritmo natural

O que quer dizer o valor do MELD?

Na interpretação da escala MELD em pacientes hospitalizados, a mortalidade em 3 meses é:

Se MELD = 40 ou mais — significa que há risco de 100% de mortalidade em 3 meses.

Se MELD = 30 a 39 — significa que há risco de 83% de mortalidade em 3 meses.

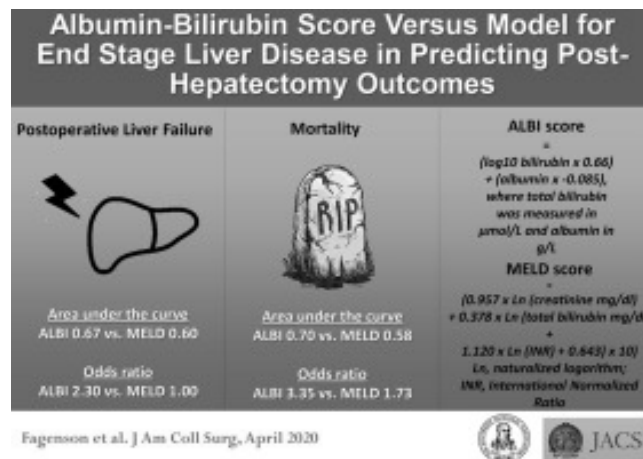
Se MELD = 20 a 29 — significa que há risco de 76% de mortalidade em 3 meses.

Se MELD = 10 a 19 — significa que há risco de 27% de mortalidade em 3 meses.

Se MELD = <10 — significa que há risco de 4% de mortalidade em 3 meses.

https://cdn.slidesharecdn.com/ss_thumbnails/meldescala-161103094733-thumbnail.jpg?width=640&height=640&fit=bounds

Anexo IV



<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1072751520300685-fx1.jpg>

ANEXO V - Critérios de falência hepática após hepatectomia 50-50

“50-50 criteria”

- At day 5 the criteria 50 – 50 (PT < 50% and Bilirubinemia > 50 µmol/L) which is an early and strong predictor (60%) of mortality can be used as a criteria of Postoperative Liver Failure.
- Most importantly, this criteria which precede any clinical evidence of complication and death by a median of 5 and 10 days can be used for:
 - early assessment of infection or portal thrombosis and
 - to implement specific therapeutic interventions such as prophylactic antimicrobial therapy, artificial liver support or even liver transplantation.

<https://image2.slideserve.com/4852447/50-50-criteria-l.jpg>

ANEXO VI

Grade	Clinical description	Treatment	Diagnosis	Clinical symptoms	Location for care
A	Deterioration in liver function	None	• UOP >0.5 mL/kg/h • BUN <150 mg/dL • >90% O₂ saturation • INR <1.5	None	Surgical ward
B	Deviation from expected post-operative course without requirement for invasive procedures	Non-invasive: fresh frozen plasma; albumin; diuretics; non-invasive ventilatory support; abdominal ultrasound; CT scan	• UOP ≤0.5 mL/kg/h • BUN <150 mg/dL • <90% O₂ saturation despite oxygen supplementation • INR ≥1.5, <2.0	• Ascites • Weight gain • Mild respiratory insufficiency • Confusion • Encephalopathy	Intermediate unit or ICU
C	Multi-system failure requiring invasive treatment	Invasive: hemodialysis; intubation; extracorporeal liver support; salvage hepatectomy; vasopressors; intravenous glucose for hypoglycemia; ICP monitor	• UOP ≤0.5 mL/kg/h • BUN ≥150 mg/dL • ≤85% O₂ saturation despite high fraction of inspired oxygen support • INR ≥2.0	• Renal failure • Hemodynamic Instability • Respiratory failure • Large-volume ascites • Encephalopathy	ICU

ISGLS, International Study Group of Liver Surgery; PHLF, post-hepatectomy liver failure.

[https://www.researchgate.net/publication/268228691/figure/tbl4/AS:614012899311617@1523403491110/SGLS](https://www.researchgate.net/publication/268228691/figure/tbl4/AS:614012899311617@1523403491110/SGLS-definition-and-grading-of-PHLF-2.png)

[S-definition-and-grading-of-PHLF-2.png](#)

ANEXO VII- Consentimento informado – estudo clínico



CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO

de acordo com a Declaração de Helsínquia¹ e a Convenção de Oviedo²

Por favor, leia com atenção a seguinte informação. Se achar que algo está incorrecto ou que não está claro, não hesite em solicitar mais informações. Se concorda com a proposta que lhe foi feita, queira assinar este documento.

Título do estudo: Impacto clínico da variação da pressão venosa portal após hepatectomia major.

Enquadramento: Projeto de investigação a efetuar no Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho no âmbito de curso de doutoramento a decorrer no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, sob orientação do Sr. Prof. Doutor Jorge Pires Maciel Barbosa (CHVNGE/UFPA), do Sr. Prof. Doutor José Guilherme Tralhão (FMUC/HUC) e do Sr. Prof. Doutor Jorge Nunes Santos (ICBAS/CHP-HGSA).

Explicação do estudo: Estudo clínico observacional prospetivo e randomizado para avaliação do impacto da elevação da pressão venosa portal após hepatectomia major na citólise e função hepáticas e na morbimortalidade.

O alvo do estudo serão os doentes submetidos a ressecção hepática major (mais de 2 segmentos hepáticos), utilizando as técnicas cirúrgicas aceites pelo colégio da especialidade, no Serviço de Cirurgia Geral do Centro Hospitalar de Gaia.

Propomo-nos medir a PVP intra-operatoriamente, antes e após ressecção hepática, através da utilização de um transdutor disponível na sala de operações e utilizado pela Anestesia para monitorizar a pressão venosa central.

Posteriormente, pretendemos relacionar a variação da PVP (antes/após hepatectomia) com a citólise e função hepáticas pós-operatórias, estimadas pelos controlos analíticos habitualmente efetuados no pós-operatório e com a morbimortalidade.

Com o intuito de termos um grupo de controlo, propomo-nos efetuar uma análise observacional dos parâmetros clínicos e analíticos no período pós-operatório, sem medição da PVP, em 15 doentes submetidos a hemicolectomia direita, na qual se induz, por definição, um aumento da PVP iatrogénico, sem alteração do remanescente hepático. Neste grupo pretende-se comprovar que não houve variação significativa dos parâmetros de citólise ou função hepáticos ao longo do tempo.

Condições e financiamento: Não acarreta custos para o doente nem para a instituição.

Confidencialidade e anonimato: Os investigadores comprometem-se a manter sob anonimato e a não registar quaisquer dados de identificação dos participantes.

Agradecendo a atenção e disponibilidade demonstradas

Identificação Investigador

Nome: Jorge Humberto Gomes Carrapita

N.º Cédula Profissional: 38085

Assinatura: _____

Declaro ter lido e compreendido este documento, bem como as informações verbais que me foram fornecidas pela/s pessoas/s que acima assina/m. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste

¹ http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Comiss%C3%A3o%20de%20%C3%89tica/Ficheiros/Declaracao_Helsinquia_2008.pdf

² <http://dre.pt/pdf1sdip/2001/01/002A00/00140036.pdf>

ANEXO VIII – ASA Score

ASA Score	Definition
ASA I	Healthy patients, non-smoking, no or minimal alcohol use
ASA II	Patients with mild systemic disease, without substantive functional limitations as current smokers, social alcohol drinkers, etc.
ASA III	Patients with severe systemic disease or substantive functional limitations. E.g., poorly controlled DM or HTN, COPD, active hepatitis, CVA, TIA or CAD/stents, etc.
ASA IV	Patients with severe systemic disease that is a constant threat to life. Examples: recent (<3 months) MI, CVA, TIA or CAD/stents, ongoing cardiac ischemia or severe valve dysfunction, severe reduction in ejection fraction, sepsis, etc.
ASA V	Moribund patients which are not expected to survive without the operation. Examples: ruptured abdominal/thoracic aneurysm, massive trauma, etc.

<https://www.researchgate.net/publication/354863112/figure/tbl1/AS:1072723451199490@1632768609871/ASA-Physical-Status-Classification-System.png>

ANEXO IX- Karnofsky Score

Score, %	State of Health
100	Healthy, no symptoms or signs of disease
90	Capable of normal activity, few symptoms or signs of disease
80	Normal activity with some difficulty, some symptoms or signs
70	Caring for self, not capable of normal activity or work
60	Requiring some help, can take care of most personal requirements
50	Requires help often, requires frequent medical care
40	Disabled, requires special care and help
30	Severely disabled, hospital admission indicated but no risk of death
20	Very ill, urgently requiring admission, requires supportive measures or treatment

<https://www.researchgate.net/publication/265095239/figure/tbl1/AS:601663266119690@1520459109464/Karnofsky-Performance-Status-Score.png>

ANEXO X Classificação Clavien – Dindo

Grade	
1	Any deviation from the normal postoperative course without the need for pharmacological treatment or surgical, endoscopic and radiological interventions. Acceptable therapeutic regimens are: drugs as antiemetics, antipyretics, analgetics, diuretics and electrolytes and physiotherapy. This grade also includes wound infections opened at the bedside.
2	Requiring pharmacological treatment with drugs other than such allowed for grade I complications. Blood transfusions, antibiotics and total parenteral nutrition are also included.
3	Requiring surgical, endoscopic or radiological intervention
3a	Intervention under regional/local anesthesia
3b	Intervention under general anesthesia
4	Life-threatening complication requiring intensive care/intensive care unit management
4a	Single organ dysfunction
4b	Multi-organ dysfunction
5	Patient demise

<https://www.researchgate.net/publication/274782049/figure/fig1/AS:508481658077184@1498242882120/Clavien-Dindo-classification-of-surgical-complications.png>

ANEXO XI – Parecer de aprovação do Comité de Ética Animal do Centro de Neurociências e Biologia Molecular de Coimbra



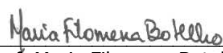
FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

BIOFÍSICA

Declaration

To whom it may concern I declare that to perform the animal studies the rats were housed and kept in accordance with the Institution of Animal Care of the University of Coimbra. All experiments were performed after Faculty of Medicine of Coimbra Ethical committee approval with the Process Number 116_2011.

Coimbra, 15 February 2016



Prof. Maria Filomena Botelho

ANEXO XII

Registo macroscópico, processamento das amostras e análise histológica

CHECKLIST

REGISTO MACROSCÓPICO, PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE MICROSCÓPICA

Estudo pré-clínico: Avaliação em modelo animal (Rato Wistar) dos efeitos da laqueação da artéria esplénica associada à hepatectomia de 2/3 na função, regeneração e viabilidade hepatocelulares.

RATO N° _____

Tempo de avaliação _____

Descrição macroscópica:

Dimensão de fragmento: _____

Outras características:

N° de fragmentos: _____

N° de Blocos: _____

Responsável: _____

Ass: _____

Responsável pelo corte, coloração HE, montagem:

Ass: _____

Análise microscópica:

➤ **Estimativa da percentagem de sinais de lesão tecidual:**

- Balonização hepatocitária
- Esteatose microvesicular
- Agregados de neutrófilos

➤ **Estimativa da necrose / apoptose hepatocitária**

--

➤ **Estimativa da regeneração hepatocelular:**

- **Índice mitótico**
(n° figuras de mitose / 10 CGA)

--

- **Ki67 (%)**

--

Técnico responsável: _____

Ass: _____

Responsável: _____

Ass: _____