

ESTUDO EXPERIMENTAL DO IMPACTO DA CLAMPAGEM SELECTIVA DA VEIA PORTA NA FUNÇÃO HEPATOCELULAR.

J. Guilherme Tralhão, Ana M. Abrantes, Cristina Gonçalves, César Carvalho, Ivan Portela, Mafalda Laranjo, Barbara Oliveiros, Dulce Cardoso, Ana Bela Sarmento Ribeiro, M. Filomena Botelho, Francisco Castro Sousa

Departamento de Cirurgia, Serviços de Clínica Cirúrgica e Cirurgia III, Instituto de Biofísica e Biomatemática, Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia, Instituto de Bioquímica e Disciplina de Biologia Molecular Aplicada e Departamento de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina e Hospitais da Universidade de Coimbra

Resumo

A influência da clampagem selectiva dos elementos da tríada do pedículo hepático na função ou viabilidade hepatocitárias são motivo de estudos clínicos e experimentais no nosso Serviço.

Objectivo - Estudo do efeito da clampagem selectiva da veia porta (VP) na função hepatocelular no modelo animal com fígado normal.

Material e métodos- 1) Animais: 52 ratos Wistar (machos, 2 meses), foram divididos em 4 grupos: Grupo A – animais submetidos a 60 minutos de clampagem da VP (CVP) (n= 21); Grupo B – CVP intermitente de 30' + 5' de reperfusão + 30' (n= 12); Grupo C – CVP intermitente de 15' + 5' de reperfusão até 60 minutos de CVP (n= 10), e Grupo D – animais sem CVP (n= 9). No fim da intervenção cirúrgica (IC) foi realizada uma biópsia hepática. 2) Doseamento da TGO, TGP, Bilirrubina total (BT), GGT, FA e LDH três dias antes e imediatamente após a IC. 3) Estudo da função de extracção hepatocitária (FEH) da ^{99m}Tc-mebrofenina 3 dias antes e após a CVP. 4) Isolamento dos hepatócitos (H) a partir da biópsia para caracterização do tipo de morte celular por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com Anexina-V e iodeto de propídeo (AV/IP). 5) Estudo estatístico: Análise de variância com medidas repetidas a um factor.

Resultados - 1) Mortalidade: A – 62%, B – 17%, C – 30% e D – 0% (p<0,03). 2) Observou-se um aumento estatisticamente significativo dos valores de TGO (p<0,025) e LDH (p=0,002), antes e após a CVP, mais sem diferenças entre os grupos A, B, C e D (ns). 4) Diminuição significativa da FEH (p<0,0001) evidente apenas no grupo A (p<0,018) mas sem diferenças entre os quatro grupos (ns). 5) Nos H isolados dos animais dos grupos A, B, C e D não se verificaram diferenças significativas na viabilidade e no tipo de morte celulares.

Conclusões - A insuficiência hepática pós-operatória é a principal causa de mortalidade após uma hepatectomia; contudo, a clampagem selectiva da veia porta, traduz-se por uma aumento da viabilidade celular e uma diminuição do tipo de morte celular (necrose ou apoptose) comparativamente a estudos anteriormente realizados por nós podendo ser uma alternativa à manobra de Pringle. Contudo, a clampagem da veia porta por períodos superiores a 30' devem ser evitadas dada a elevada mortalidade verificada.

Summary

The impact of selective clamping of portal vein in hepatocellular function. An experimental study.

The influence of selective clamping of the elements of hepatic pedicle in the hepatocellular function and viability were evaluated in our department.

Aim - Study the effect of selective clamping of the portal vein (CPV) in hepatocellular function in an animal model with normal liver.



Methods - Three groups of Wistar rats (males, 2 months) were subjected a CPV for 60 min: group A (n=21) submitted to a continuous inflow occlusion; group B (n=12) underwent to a CPV for 30 min with 5 min of reperfusion; group C (n=10) underwent a CPV for 15 min with 5 min of reperfusion. The group D (n=9) was not subjected to a CPV. A hepatic biopsy was done at the end of surgery. The degree of tissue injury was evaluated using: 1) Blood markers: AST, ALT, total-bilirubin (TB), GGT, alkaline phosphatase, LDH and hepatic extraction fraction (HEF) by radioisotopic methods three days before laparotomy (BS) and after surgery (AS); 2) apoptosis, necrosis were investigated after collagenase cell isolation from hepatectomy pieces by flow-cytometry using the followed probes: propidium-iodide and annexin-V. Statistical analysis: variance analysis, post-hoc comparisons by Tukey-test ($p < 0.05$).

Results - 1) Mortality: Group A-62%, Group B-17%, Group C-30%, Group D-0% ($p < 0,03$). 2) We observed statistical differences in these parameters: ALT ($p < 0.025$) and LDH ($p < 0.002$) preferentially in groups A but without differences between the A, B, C and D groups (ns). 3) We also verified a significant decrease in HEF values ($p < 0.0001$) preferentially in group A without differences between the groups. 4) No difference was observed when analysed apoptosis and necrosis and cell viability between the groups.

Conclusions - Postoperative liver failure is the leading cause of mortality after hepatectomy, however selective clamping of the portal vein, is reflected in an increase in cell viability and a decrease in the type of cell death (necrosis or apoptosis) compared to studies carried out previously by us and thus may be regarded as an alternative to the Pringle maneuver. However, selective clamping of the portal vein for periods above 30' should be avoided, given the high mortality verified.

INTRODUÇÃO

O tratamento cirúrgico dos tumores primários ou metastáticos do fígado continua a ser a única opção terapêutica com potencialidades curativas. Vários factores clínicos, anato-mopatológicos ou cirúrgicos têm sido referidos como preditivos das sobrevidas sem doença ou à distância após o tratamento cirúrgico curativo. As perdas sanguíneas e as transfusões per-operatórias são referidas como factores de risco de mortalidade, morbidade e de sobrevida dos doentes com tumores hepáticos primários ou secundários submetidos a tratamento cirúrgico¹. Todos os cuidados devem ser tidos de forma a diminuir a hemorragia e as transfusões per-operatórias. A clampagem do pedículo hepático (manobra de Pringle) associada a uma pressão venosa central baixa são factores determinantes na diminuição da hemorragia per-operatória^{2,6}. Contudo os efeitos da clampagem do pedículo hepático e a duração da isquémia na função ou viabilidade hepatocitárias são controversos e motivo de estudo⁷⁻¹³.

Este estudo experimental tem como objectivo avaliar os efeitos da clampagem selectiva da veia porta (CVP) e sua duração na função hepatocelular num modelo animal com fígado normal.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Após anestesia por via intraperitoneal foram utilizados 52 ratos Wistar machos, com 2 meses de idade, que foram agrupados em quatro grupos: Grupo A - animais submetidos a 60 minutos de clampagem da veia porta (n=21) Grupo B - animais submetidos a clampagem intermitente da VP de 30 minutos e 5 minutos de reperusão até um total de 60 minutos clampagem (n=12); Grupo C - animais submetidos clampagem intermitente de 15 minutos de clampagem da VP e 5 minutos de reperusão até 60 minutos de clampagem da VP (n=10), e Grupo D - animais submetidos a laparotomia sem clampagem da VP (n=9).

Após os 60 minutos de laparotomia com ou sem clampagem do pedículo hepático os animais foram subme-

tidos a uma biópsia hepática. Foi avaliada a mortalidade per-operatória e durante as 24 horas após o gesto cirúrgico.

Estudo da Função de Extracção Hepatocitária com ^{99m}Tc-mebrofenina

Os animais foram injectados na veia da cauda com cerca de 37 MBq de mebrofenina marcada com tecnécio-^{99m}. A aquisição da informação para o cálculo da fracção de extracção hepatocitária, é feita através de uma câmara de raios gama, com o animal em decúbito ventral, sobre o colimador. Após este posicionamento, inicia-se uma aquisição dinâmica (matriz de 128x128) em duas fases consecutivas (primeiro 60 imagens de 1 segundo cada seguidas de 59 imagens com duração individual de 1 minuto); estas aquisições dinâmicas são seguidas de uma imagem estática em vista anterior.

Para o processamento, são desenhadas zonas de interesse sobre o coração e o fígado para se obterem as respectivas curvas tempo/actividade. É através destas curvas que se calcula a fracção de extracção hepatocitária. A função hepatocitária é calculada através da desconvolução da curva actividade/tempo hepática com a curva actividade/tempo cardíaca.

Avaliação das alterações morfológicas e bioquímicas hepatocelulares dos animais submetidos a diferentes tipos de clampagem selectiva da veia porta. Avaliação bioquímica

Doseamento séricos das transaminases (TGO e TGP), da bilirrubina total, da GGT, da fosfatase alcalina e da da LDH em sangue colhido de veia da cauda, três dias antes e imediatamente após a intervenção cirúrgica.

Isolamento de hepatócitos para estudos de citometria de fluxo

Os hepatócitos de rato foram obtidos das biópsias hepáticas de peças e perfundidas com 0,05% de collagenase como previamente descrito¹⁴. Posteriormente analisou-se o tipo de morte celular induzido pelos diferentes tipos de clampagem selectiva da veia porta, e alguns dos mecanismos envolvidos, em particular a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a participação da mitocôndria, através da

avaliação da variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mit}$).

Caracterização do tipo de morte celular

A caracterização do tipo de morte celular foi efectuada por microscopia óptica e por citometria de fluxo. No primeiro caso, procedeu-se à caracterização morfológica dos esfregaços de hepatócitos isolados a partir de um fragmento de biópsia hepática, como referido anteriormente, corados com Solução de May-Grünwald-Giemsa. No segundo caso, recorreu-se à dupla marcação das células com Anexina V e iodeto de propídio (AV/IP), de acordo com as instruções do kit de detecção de morte celular da Immunotech (Becton Dickinson). Para o efeito, cem mil células foram incubadas com 1 μ L de anexina V-FITC e 5 μ L de IP, durante 15 minutos ao abrigo da luz. Os hepatócitos foram depois analisados num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de argon utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525 nm e de 640 nm, respectivamente para a AV-FITC e para o IP. Esta técnica permite discriminar as células viáveis (não marcadas com AV e IP), as células em apoptose inicial (marcadas unicamente com AV), as células em apoptose tardia/necrose (marcadas simultaneamente com AV e IP) e as células em necrose (marcadas com IP)¹⁵.

Avaliação da produção de ROS e do potencial de membrana mitocondrial

A expressão intracelular de peróxidos e a variação do potencial de membrana mitocondrial (mit) foi determinada por citometria de fluxo seguindo a oxidação intracelular da sonda não fluorescente, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, DCFH-DA, e através da utilização da sonda fluorescente 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil iodeto de carbocianina, JC1, respectivamente. A sonda DCFH-DA entra nas células e acumula-se principalmente no citosol onde é desacetilada por esterases intracelulares e depois oxidada na presença de peróxidos a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que é facilmente visualizada pela emissão de fluorescência no comprimento de onda de 525 nm quando excitada a 488nm¹⁶. Por outro lado, o JC1 é um catião lipofílico que atravessa facilmente as membranas biológicas acumulando-se no interior da mitocôndria. Quando ocorre diminuição do $\Delta\Psi_{mit}$ o JC1 permanece no citoplasma sob a forma monomérica (M) exibindo fluorescência verde no comprimento de onda de 525 nm. Quando o $\Delta\Psi_{mit}$ aumenta os monómeros de JC1 entram na mitocôndria formando agregados (A) que exibem fluorescência vermelha detectada no comprimento de onda de 590 nm^{17,18}. Desta forma, a razão M/A, dá uma indicação do mit. Assim, os hepatócitos isolados a partir de biópsias de fígado de ratos submetidos a clampagem selectiva da veia porta por diferentes períodos de tempo, foram incubados com 5 μ M de DCFH-DA (Molecular Probes, Invitrogene) durante 45 minutos e com 5 μ g/mL de JC1 (Molecular Probes, Invitrogene) durante 15 minutos a 37°C, respectivamente, em atmosfera apropriada e ao abrigo da luz, e posteriormente analisados por citometria de fluxo.

Estudo estatístico

Para a análise dos resultados utilizámos um estudo de variância com medidas repetidas a um factor. Quando necessário foi usado o teste Turkey ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Mortalidade

Não se verificou mortalidade operatória. A mortalidade pós-operatória foi de 62% no Grupo A (animais submetidos a 60 min de clampagem contínua de CVP), de 17% no Grupo B (animais submetidos a clampagem intermitente da VP de 30 minutos e 5 minutos de reperfusão até um total de 60 minutos clampagem), de 30% no Grupo C (animais submetidos clampagem intermitente de 15 minutos de clampagem da VP e 5 minutos de reperfusão até 60 minutos de clampagem da VP) e de 0% no Grupo D (animais sem clampagem da VP). Foi observado um aumento significativo da mortalidade dos animais do grupo A comparativamente aos outros grupos ($p < 0,03$).

Estudo analítico

Dos vários parâmetros analíticos avaliados verificou-se um aumento global do pré-operatório para o pós-operatório, com significado estatístico, dos valores da TGO ($p = 0,001$), da TGP ($p = 0,005$), da GGT ($p = 0,006$), da FA ($p = 0,048$), da bilirrubina total ($p = 0,013$), da LDH ($p = 0,011$), mas sem diferenças entre os Grupos A, B, C e D (ns).

Estudo da função hepatocelular através da avaliação da fracção de extracção hepatocitária por métodos radioisotópicos

Observou-se uma diminuição da fracção de extracção hepatocitária avaliada por métodos radioisotópicos (99mTc-mebrofenina) com significado estatístico evidente apenas no Grupo A mas sem diferenças entre os Grupos (Figura 1).

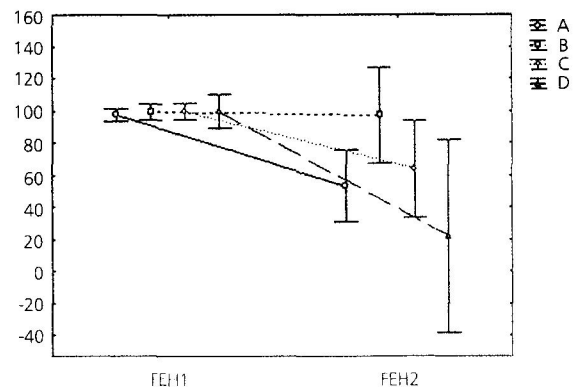


Figura 1

Estudo da função hepatocelular através da avaliação da fracção de extracção hepatocitária por métodos radioisotópicos.

Observou-se uma diminuição da fracção de extracção hepatocitária avaliada por métodos radioisotópicos (99mTc-mebrofenina) com significado estatístico evidente apenas no Grupo A mas sem diferenças entre os Grupos (ns). Os resultados são expressos em % e representam a média \pm desvio padrão de cada grupo em estudo. Grupo A - animais submetidos a 60 minutos de clampagem da veia porta (VP) (n=21); Grupo B - animais submetidos a clampagem intermitente da VP de 30 minutos e 5 minutos de reperfusão até um total de 60 minutos clampagem (n=12); Grupo C - animais submetidos clampagem intermitente de 15 minutos de clampagem da VP e 5 minutos de reperfusão até 60 minutos de clampagem da VP (n=10), e Grupo D - animais submetidos a laparotomia sem clampagem da VP (n=9).



Estudo da viabilidade e morte celular e avaliação da produção de ROS e do potencial de membrana mitocondrial

Os diferentes tipos de clampagem selectiva da veia porta não induzem alterações significativas na viabilidade dos hepatócitos isolados do fígado dos ratos. Do mesmo modo, não se verificaram diferenças com relevância estatística no número de células em apoptose/necrose. No entanto, como se pode observar na Figura 2, verifica-se uma ligeira tendência para o aumento da percentagem de células em necrose nos hepatócitos isolados dos ratos submetidos a clampagem selectiva da veia porta, relativamente aos hepatócitos controlo (não sujeitos a clampagem).

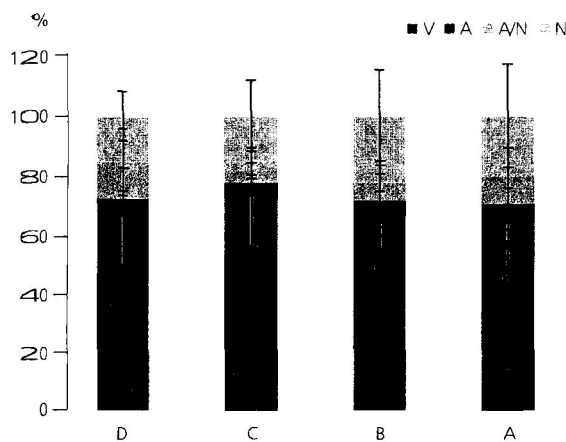


Figura 2

Avaliação do efeito da duração da clampagem selectiva da veia porta na viabilidade hepatocitária por citometria de fluxo.
Os hepatócitos de rato dos diferentes grupos em estudo, A a D, foram obtidos das biópsias hepáticas, perfundidas com 0,05% de collagenase H e posteriormente marcados com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP), de acordo o descrito na secção material e métodos. V-células viáveis; A-células em apoptose inicial; A/N-células em apoptose tardia/necrose; N-células em necrose. Os resultados são expressos em % e representam a média ± desvio padrão de cada grupo em estudo.

Apesar de se observar aumento da produção de ROS no grupo A e B e diminuição no grupo C, comparativamente ao grupo controlo (grupo D), estas diferenças não são estatisticamente significativas (Figura 3).

Por outro lado, como se pode observar na Figura 4, a clampagem selectiva da veia porta induz, tendencialmente, aumento da razão monómeros/agregados de JC1, traduzindo diminuição do potencial de membrana mitocondrial e, consequentemente, maior susceptibilidade à apoptose. Estes resultados estão de acordo com a mortalidade pós-operatória observada nos diferentes grupos de ratos.

DISCUSSÃO

As perdas sanguíneas per-operatórias e as transfusões sanguíneas são factores de risco de morbilidade e mortalidade após hepatectomia^{1,2}. Diferentes métodos de controlo vascular tais como a exclusão total vascular total, a

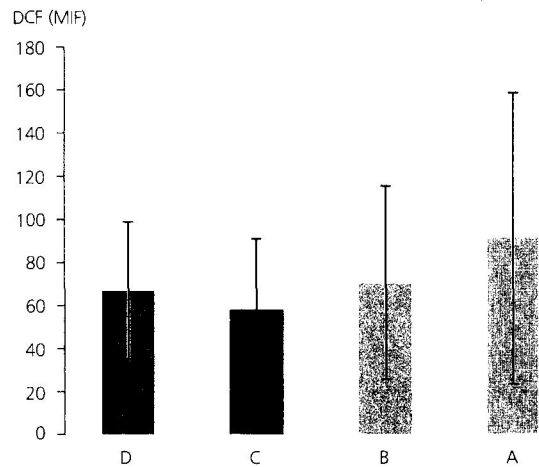


Figura 3

Análise da produção de ROS nos hepatócitos de rato submetidos a clampagem selectiva da veia porta.
O níveis intracelulares de ROS nos hepatócitos de rato dos diferentes grupos em estudo foram determinados por citometria de fluxo recorrendo à marcação com DCFH2-DA, de acordo o descrito na secção material e métodos. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (MIF) de DCF e representam a média ± desvio padrão de grupo em estudo.

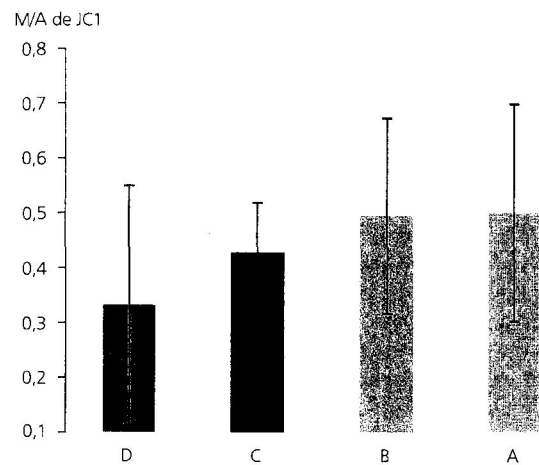


Figura 4

Análise do potencial de membrana mitocondrial em hepatócitos de rato submetidos a clampagem selectiva da veia porta por diferentes períodos de tempo.
O potencial de membrana ($\Delta\psi_{mit}$) foi avaliado por citometria de fluxo em hepatócitos isolados de fígado de rato, através da razão entre os monómeros e os agregados (M/A) do composto fluorescente JC1, de acordo com o descrito na secção material e métodos. O JC1 entra selectivamente na mitocôndria e, dependendo do potencial de membrana mitocondrial, exhibe forma monomérica ou agregada. Assim, quando há despolarização mitocondrial, ou seja diminuição do potencial de membrana mitocondrial, o JC1 predomina na forma monomérica verificando-se aumento da razão M/A de JC1. Os resultados representam a média ± desvio padrão da razão M/A de JC1 de cada grupo em estudo.

manobra de Pringle, a clampagem selectiva da artéria e ramos portais esquerdo ou direito, a clampagem supra-selectiva ou a oclusão vascular intra-hepática são usadas para reduzir a



hemorragia durante uma ressecção hepática. No entanto, todos estes gestos podem levar a lesões de isquemia ou de reperfusão, à activação de células de Kupffer e à produção espécies reactivas de oxigénio ou de citocinas, tais como o factor de necrose tumoral ou a interleucina 8 e consequentes lesão das células endoteliais, do parênquima hepático e consequente disfunção hepatocelular¹⁹.

A lém de potenciais complicações pós-operatórias, estudos têm sugerido que as lesões de isquemia e reperfusão hepáticas após clampagem da triada portal podem estimular a metástase com a consequente diminuição da sobrevivência dos doentes operados^{19,20}. Estudos experimentais realizados em animais submetidos a 20 ou 30 min de isquemia de um lobo hepático, revelaram que a progressão tumoral foi mais significativa no lobo clampado selectivamente que no contra-lateral²¹. De facto, a isquemia microvascular associa-se a alterações das células endoteliais que aumentam a capacidade de adesão das células tumorais às do endotélio promovendo a progressão de metástases hepáticas por via hematogénica²². Outro possível mecanismo explicativo para que a oclusão da triada portal estimule a progressão das metástases hepáticas foi proposto num estudo experimental num modelo murino submetido a 45 min de clampagem continua em que se verificou uma profunda alteração microcirculação hepática devido a necrose celular por hipoxia²³. A hipoxia prolongada induz a activação do factor 1 α que por sua vez promove a activação vários genes e consequente síntese de factores de crescimento proangiogénicos, de proliferação e diferenciação, surgindo um microambiente ideal para tumorigénese²⁴. No entanto, esta correlação entre clampagem do pedículo hepático e a aceleração do crescimento tumoral é observado apenas após clampagens contínuas²⁵. De facto, os mesmos autores observaram que as clampagens intermitentes parecem exercer um efeito protector contra o crescimento metastático pois associa-se a uma ausência ou menor necrose do parênquima hepático e da função hepatocelular²⁵. Este resultados são consistentes com os estudos experimentais e clínicos realizados por nós e outros autores que demonstram que parênquima hepático é mais tolerante a uma clampagem intermitente do pedículo hepático¹³.

Embora a clampagem intermitente do pedículo hepático por períodos de 15 min nos doentes com um fígado normal ou de 10 min nos cirróticos permite tempos de clampagens totais superiores a 60 min o objectivo deste trabalho foi avaliar se a clampagem selectiva da veia porta permite tempos de clampagem continua mais prolongados mantendo o mesmo grau de protecção do parênquima hepático e da função hepatocelular. Eventualmente, esta estratégia cirúrgica poderá permitir uma redução da hemorragia per-operatória durante a hepatectomia mantendo a irrigação arterial e consequentemente uma diminuição do risco de hipoxia do parênquima hepático.

Será que a CVP por períodos mais prolongados associa-se a uma mortalidade inferior comparativamente à manobra de Pringle?

Um estudo clínico demonstrou que a manobra de Pringle com ciclos de clampagem com a duração de 15 minutos, seguidos de 5 minutos de reperfusão em pacientes submetidos a ressecção hepática, aumenta a tolerância do parênquima hepático comparativamente à clampagem continua particularmente em doentes com hepatopatias crónicas²⁶.

No estudo realizado por nós, verificamos que a clampagem selectiva da veia porta até 30 minutos não se associou

a um aumento estatisticamente significativo da mortalidade comparativamente aos animais clampados continuamente durante 15 minutos ou não clampados. Comparativamente aos dados da literatura, embora os resultados sejam contraditórios em modelos animais, o nosso estudo sugere uma vantagem em relação à mortalidade pós-operatória dos animais submetidos à manobra de Pringle¹³.

Será que a clampagem selectiva da veia porta por períodos mais longos associa-se a uma alteração mais significativa da função hepatocelular?

O estudo da função hepatocelular tem sido avaliado por múltiplos métodos. Nós optamos pela avaliação bioquímica através do estudo pré-operatório e pós-operatório dos parâmetros biológicos normalmente utilizados na avaliação da função hepática e no estudo da fracção de extracção hepatocelular utilizando a ^{99m}Tc-mebrofenina. No que diz respeito aos parâmetros analíticos verificamos um aumento significativo dos valores da TGO, da TGP, da GGT, da FA, da bilirrubina total e da LDH em todos os animais submetidos a diferentes protocolos de clampagem selectiva da veia porta mas sem diferenças entre os três grupos. Por outro, a avaliação dinâmica da função hepatocelular através do estudo da fracção de extracção hepatocelular por métodos radioisotópicos mostrou uma diminuição significativa deste valor nos animais em que a veia porta foi clampada continuamente durante 60 minutos (Grupo A) mas sem diferenças com significado estatístico entre os diferentes grupos de animais. O estudo da fracção de extracção hepatocelular por métodos radioisotópicos permite estudar a capacidade do hepatócito captar o traçador radioactivo, transporta-lo no citoplasma e excreta-lo para os canaliculos biliares. Assim podemos durante este exame estudar de forma dinâmica vários aspectos da função do hepatócito e com maior acuidade avaliar a sua função. Neste estudo, apesar de não verificamos diferenças com significado estatístico da fracção de extracção hepatocelular do radiofármaco entre os diferentes grupos de animais em que a veia porta foi clampada selectivamente, verificamos contudo que esta diminuição foi mais significativa nos animais clampados continuamente durante 60 minutos. Este parâmetro talvez ajude a compreender a maior mortalidade pós-operatória verificada nos animais do grupo A.

Será que a clampagem selectiva da veia porta por períodos mais prolongados associa-se a uma menor viabilidade e maior morte hepatocelular?

Neste estudo verificamos que os diferentes tipos de clampagem selectiva da veia porta não induziram alterações significativas na viabilidade dos hepatócitos isolados do fígado dos ratos. A metodologia utilizada revelou que a percentagem de células hepatocelulares (não marcadas com anexina V e iodeto de propídio), ou de células em apoptose inicial (marcadas unicamente com anexina V), ou aquelas em apoptose tardia/necrose (marcadas simultaneamente com anexina V e iodeto de propídio) e as células em necrose (marcadas apenas com iodeto de propídio) não diferia de forma significativa entre os grupos de animais submetidos a diferentes tipos de clampagem da veia porta. No que diz respeito à expressão intracelular de peróxidos e a variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mit}$) determinada por citometria de fluxo, observamos um aumento relativo mas sem significado estatístico da produção de ROS no grupo A e B. Por outro lado, a clampagem selectiva da veia porta induz um diminuição do potencial de membrana mitocondrial, traduzida por um aumento da razão monómeros/agregados de JC1

(Figura 4) e, consequentemente, maior susceptibilidade à apoptose, embora estatisticamente não significativa, das células isoladas dos fígados dos animais em que a veia porta foi clampada por períodos mais prolongados. Estes resultados, no seu conjunto, poderão justificar o aumento da mortalidade pós-operatória verificada nos animais do grupo A.

CONCLUSÃO

A insuficiência hepática pós-operatória é a principal

causa de mortalidade após uma hepatectomia, contudo a clampagem selectiva da veia porta, traduz-se por um aumento da viabilidade celular e uma diminuição do tipo de morte celular (necrose ou apoptose) comparativamente a estudos anteriormente realizados por nós podendo ser uma alternativa à manobra de Pringle. Contudo clampagens selectivas da veia porta por períodos superiores a 30' devem ser evitadas dada a elevada mortalidade verificada nos animais submetidos a clampagem de 60 minutos de acordo com os resultados obtidos neste estudo em que utilizamos um modelo animal com fígado normal.

BIBLIOGRAFIA

1. Trahão JG, Kayal S, Dagher I, Sanhueza M, Vons C, Franco D. Resection of hepatocellular carcinoma: the effect of surgical margin and blood transfusion on long-term survival. Analysis of 203 consecutive patients. *Hepatogastroenterology*. 2007;54: 1210-6.
2. Franco D. Liver surgery has become simpler. *Eur J Anaesthesiol* 2002;19:777-779.
3. Méndez JA, Arslan V, Fischer ME, Wuest D, Jarnagin WR, Fong Y, Blumgart LH. Perioperative outcomes of major hepatic resections under low central venous pressure anesthesia: blood loss, blood transfusion, and the risk of postoperative renal dysfunction. *J Am Coll Surg* 1998;187: 620-625.
4. Ma K, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL, Wong J. Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Ann Surg* 1997;226: 704-711; discussion 711-703.
5. Claien PA, Emond J, Vauthey JN, Belghiti J, Chari RS, Strasberg SM. Protection of the liver during hepatic surgery. *J Gastrointest Surg* 2004;8: 313-327.
6. Jarnagin WR, Gonen M, Fong Y, DeMatteo RP, Ben-Porat L, Little S, Corvera C, Weber S, Blumgart LH. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade. *Ann Surg* 2002; 236: 391-406; discussion 406-397.
7. Ma K, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL, Wong J. Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Ann Surg* 1997; 226: 704-711; discussion 711-703.
8. Claien PA, Emond J, Vauthey JN, Belghiti J, Chari RS, Strasberg SM. Protection of the liver during hepatic surgery. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 313-327.
9. Bezoni E, Lorenzin D, Baccarani U, Adani GL, Favero A, Cojutti A, Bresadola F, Uzzau A. Resective surgery for liver tumor: a multivariate analysis of causes and risk factors linked to postoperative complications. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 521-533.
10. Grzi GL, Mazziotti A, Jovine E, Pierangeli F, Ercolani G, Gallucci A, Cavallari A. Total vascular exclusion of the liver during hepatic surgery. Selective use, extensive use, or abuse? *Arch Surg* 1997; 133: 1104-1109.
11. Mauchi M, Kosuge T, Takayama T, Yamazaki S, Kakazu T, Miagawa S, Kawasaki S. Surgery for small liver cancers. *Semin Surg Oncol* 1993; 9: 298-304.
12. Belghiti J, Di Carlo I, Sauvanet A, Uribe M, Fekete F. A ten-year experience with hepatic resection in 338 patients: evolutions in indications and of operative mortality. *Eur J Surg* 1994; 160: 271-282.
13. Trahão JG, Abrantes AM, Portela I, Gonçalves C, Figueirinha R, Cardoso D, Sarmento AB, Ponciano E, Botelho MF, Castro-Sousa F. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 34;suppl 2:S318.
14. Trahão JG, Roudier J, Morosan S, Giannini C, Tu H, Goulenok C, Canot F, Zavala F, Joulin V, Kremsdorf D, Bréchet C. 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;14;99:6991-6.
15. Aubry JP, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, Jeannin P, Herbault N, Caron G, Moine V. Annexin-V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry* 1999; 37: 197-204.
16. Halliwell B. and 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? *British Journal of Pharmacology* 2004; 142:231-55.
17. Yao J, Jiang Z, Duan W, Huang J, Zhang L, Hu L, He L, Li F, Xiao Y, Shu B, Liu C. Involvement of mitochondrial pathway in triptolide-induced cytotoxicity in human normal liver L-02 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2008; 31: 592-597.
18. Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C. A new method for the flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197:40-45.
19. Wong KH, Hamady ZZ, Malik HZ, Prasad R, Lodge JP, Toogood GJ. Intermittent Pringle manoeuvre is not associated with adverse long-term prognosis after resection for colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2008;95:985-9.
20. Gomez D, Morris-Stiff G, Wyatt J, Toogood GJ, Lodge JP, Prasad KR. Surgical technique and systemic inflammation influences long-term disease-free survival following hepatic resection for colorectal metastasis. *J Surg Oncol*. 2008; 1;98:371-6.
21. Ku Y, Kusunoki N, Shiotani M, Maeda I, Iwasaki T, Tominaga M, Kitagawa T, Fukumoto T, Suzuki Y, Kuroda Y. Stimulation of haematogenous liver metastases by ischaemia-reperfusion in rats. *Eur J Surg*. 1999;165:801-7.
22. Doi K, Horiuchi T, Uchinami M, Tabo T, Kimura N, Yokomachi J, Yoshida M, Tanaka K. Hepatic ischemia-reperfusion promotes liver metastasis of colon cancer. *J Surg Res*. 2002; 105:243-7.
23. van der Bilt JD, Soeters ME, Duyverman AM, Nijkamp MW, Witteveen PO, van Diest PJ, Kranenburg O, Borel Rinkes IH. Perinecrotic hypoxia contributes to ischemia/reperfusion-accelerated outgrowth of colorectal micrometastases. *Am J Pathol*. 2007; 170:1379-88.
24. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*. 2006; 93:E73-80.
25. van der Bilt JD, Kranenburg O, Nijkamp MW, Smakman N, Veenendaal LM, Te Velde EA, Voest EE, van Diest PJ, Borel Rinkes IH. Ischemia/reperfusion accelerates the outgrowth of hepatic micrometastases in a highly standardized murine model. *Hepatology*. 2005;42:165-75.
26. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg*. 1999; 229:369-75.

