



MÉTODOS CIRÚRGICOS PARA UTILIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS HEPÁTICOS ACELULARES EM TRANSPLANTES HEPÁTICOS

Ricardo Martins-Santos (1), Marlon Lemos Dias (1), Cíntia Marina Paz Batista (1), Alexandre Cerqueira da Silva (2), Regina Coeli dos Santos Goldenberg (1)
(1) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil
(2) Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro, Brasil

Email: ricardo.smr@gmail.com

OBJETIVO

Propor duas técnicas cirúrgicas para efetuar o transplante do Arcabouço Hepático Acelular (AHA) em ratos Wistar: transplante ortotópico parcial e transplante heterotópico.

MÉTODO

No transplante ortotópico parcial, o lobo mediano foi clampeado e uma ressecção de 10% foi realizada. Em seguida, o AHA foi colocado abaixo da região previamente seccionada do fígado receptor e ambos foram suturados com fio de seda 7-0. O transplante heterotópico está ilustrado na Fig. 1.

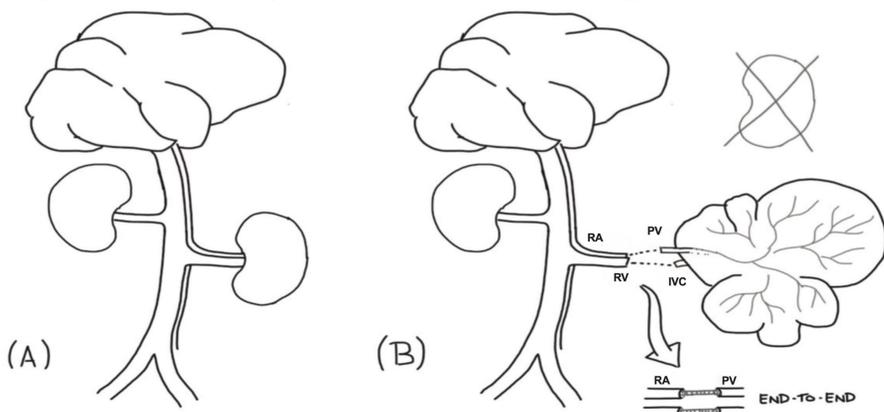


Fig. 1: Ilustração esquemática do modelo de transplante hepático heterotópico. Sistema arterio-venoso do rato doador antes da nefrectomia esquerda (A). Transplante heterotópico de arcabouço acelular no rato receptor (B). As abreviações RA, PV, IVC e RV indicam artéria renal, veia porta, veia cava inferior e veia renal, respectivamente.

RESULTADOS

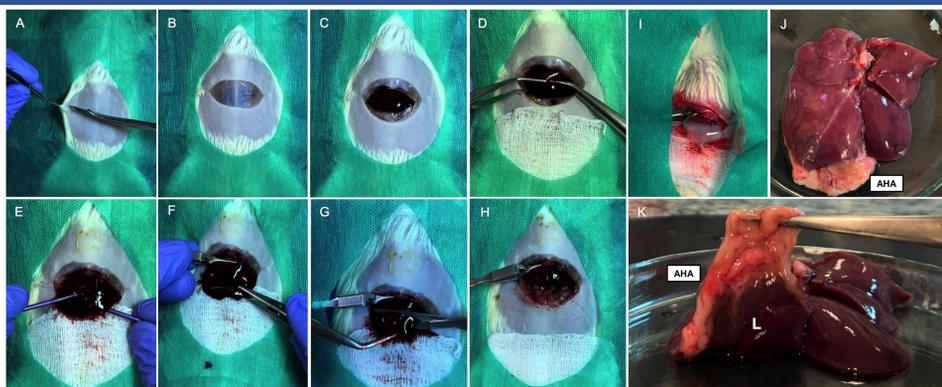


Fig. 2: Transplante ortotópico parcial de AHA. O rato é colocado em posição supina. Uma incisão abdominal transversa é feita, seguindo as etapas da laparotomia (A, B). O lobo mediano é exposto (C) e rebatido para fora da cavidade abdominal utilizando-se de fórceps Nugent (D) ou bastões de algodão (E). Em seguida, um clamp tipo bulldog é fixado na base do lobo mediano (F). Em seguida, é ressecado 10% do lobo mediano (G). Aspecto após ressecção do lobo mediano (H). A AHA é conectada ao lobo mediano do receptor por meio de sutura com seda 7-0 (I). Aspecto do fígado receptor 30d pós-transplante ortotópico parcial de AHA. "AHA" indica a aparência da AHA pós-transplante (J). AHA e integração do tecido do fígado receptor e vascularização 30d pós-transplante ortotópico parcial (K).

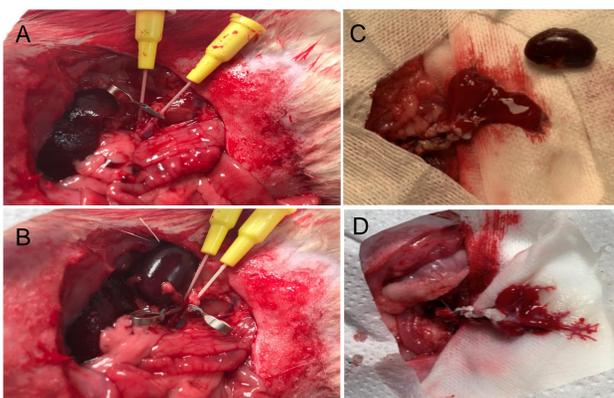


Fig. 3: Transplante heterotópico de AHA. Canulação de Veia Renal Esquerda (VRE) e Artéria Renal Esquerda (ARE) (A). Dissecação e excisão do rim esquerdo (B). Anastomose término-terminal utilizando técnica de cuff entre a veia porta do enxerto e a ARE do enxerto e entre a veia cava inferior do enxerto e a VRE do receptor (C). Reperusão do AHA com sangue arterial do receptor (C, D).

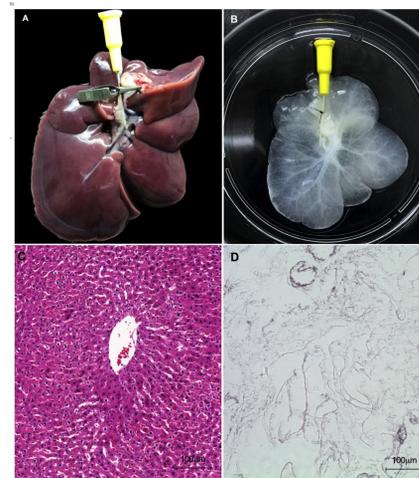


Fig. 4: Aspecto macroscópico e microscópico do fígado normal e AHA. Estrutura hepática normal (A) e acelular (B). Coloração com HE do fígado normal (C) e estrutura hepática acelular (D). Ampliação de 10x e 20x, respectivamente. Barras de escala: 100 µm.

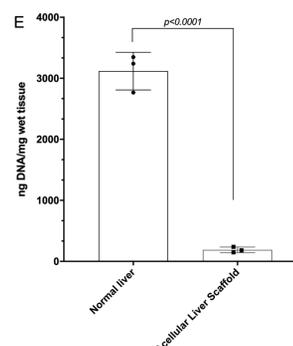


Fig. 5: A quantificação de DNA demonstrou redução significativa de DNA de 3118,4 ng/mg no fígado normal para 189,06 ng/mg no arcabouço hepático acelular. N = 3 triplicatas biológicas, * p < 0,05.

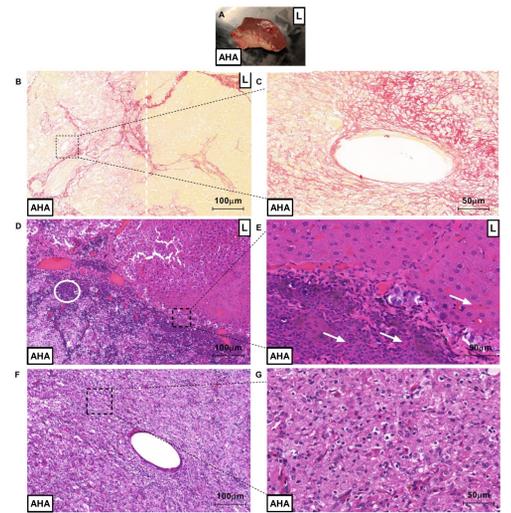


Fig. 6: Conexão do tecido entre o fígado receptor (representado por "L") e o AHA 3d pós-transplante ortotópico parcial (A). Visão microscópica de cortes hepáticos obtidos após 30 dias do transplante (B, C, D, E, F e G). A coloração com Sirius red mostra a delimitação entre a área do AHA transplantada e a área do fígado receptor. A linha pontilhada branca representa o AHA e a área de conexão do tecido hepático receptor (área lesada / fibrótica) (B). Ampliação da estrutura semelhante a um vaso sanguíneo formada na AHA transplantada (C). A área do receptor do fígado (representada por "L") parece um parênquima hepático normal 30d pós-transplante (C). A infiltração de células inflamatórias (círculo branco) foi detectada na área do AHA (D). Células vermelhas do sangue (setas brancas) foram detectadas em vasos da AHA e em sinusóides do fígado receptor (E). A AHA foi completamente recelularizada pós-transplante ortotópico (F e G). Barras de escala: 100 µm (B, D e F), 50 µm (C, E e G), 10x e 20x, respectivamente.

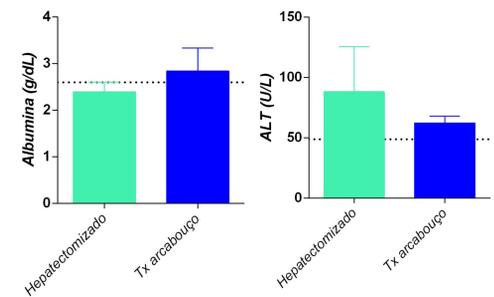


Fig. 7: Albumina e ALT para controle (hepatectomizado) e transplante ortotópico em 30d pós-procedimento.

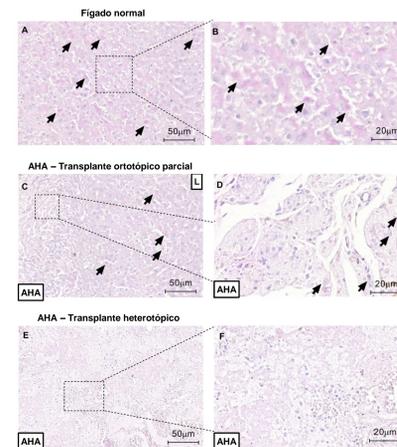


Fig. 8: O AHA transplantado induz a migração de hepatócitos 30d pós-transplante. A coloração de PAS confirma o armazenamento de glicogênio (setas pretas) em AHA transplantado ortotopicamente (B). Nenhum armazenamento de glicogênio foi detectado no AHA transplantado heterotopicamente. Amostras normais de fígado (A e B) foram utilizadas como controle. Barras de escala: 50 µm (A, C e E), 20 µm (B, D e F), respectivamente.

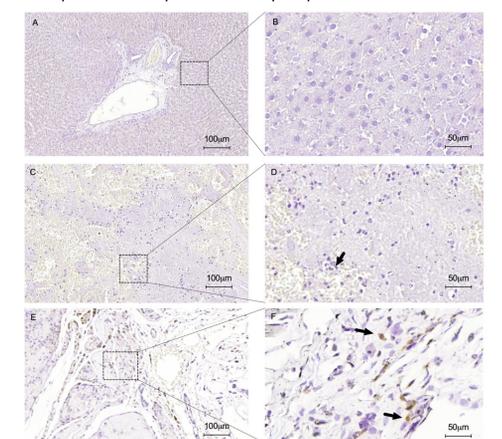


Fig. 9: Imunohistoquímica para detecção de núcleos apoptóticos usando o método TUNEL. Nenhum núcleo apoptótico foi detectado em seções de fígado normais representadas em baixa (A) e alta ampliação (B). A análise TUNEL confirmou células apoptóticas no AHA transplante heterotópico (C e D) e ortotópico (E e F) (setas pretas). Amostras normais de fígado (A e B) foram utilizadas como controle. Barras de escala: 100 µm (A, C e E), 50 µm (B, D e F), respectivamente.

CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram o grande potencial de recrutamento celular in vivo do AHA quando transplantado utilizando duas das grandes técnicas cirúrgicas de transplante da microcirurgia experimental e sugerem que o AHA apresenta grande potencial terapêutico alternativo para o transplante hepático.

REFERÊNCIAS: Uygun BE, Price G, Saeidi N, Izamis ML, Berendsen T, Yarmush M, Uygun K. Decellularization and recellularization of whole livers. J Vis Exp. 2011;48:e2394. doi:10.3791/2394.

Hori T, Uemoto S, Zhao X, Chen F, Baine AT, Gardner LB, Ohashi N, Conkle F, Castanedes-Casey M, Phillips VR. Surgical guide including innovative techniques for orthotopic liver transplantation in the rat: key techniques and pitfalls in whole and split liver grafts. A Gastr. 2010;23:270-95.