

AVALIAÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO E COX-2 NA CICATRIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM NEOPLASIA DE EHRlich

Growth factors and Cox2 in wound healing: an experimental study with Ehrlich tumors

Flávio L. L. **SALGADO**¹, Ricardo **ARTIGIANI-NETO**¹, Gaspar de Jesus **LOPES-FILHO**¹

Trabalho realizado no ¹Programa de Pós-graduação em Ciência Cirúrgica Interdisciplinar, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil

DESCRIPTORIOS - Carcinoma. Tumor de Ehrlich. Cicatrização. Cyclo-oxygenase 2. Fator de crescimento do endotélio vascular. Fator de crescimento dos fibroblastos 2. Receptor-1.

RESUMO – Racional: A cicatrização é fenômeno biológico inato, e a carcinogênese adquirido, mas com elementos humorais e celulares comuns. A carcinogênese interfere de forma negativa na cicatrização. **Objetivo:** Avaliar as modificações histológicas nas cicatrizes laparotômicas de camundongos Balb/c sadios como controles, e com a neoplasia de Ehrlich, em suas diferentes formas de apresentação. **Métodos:** Foram utilizados 54 camundongos, divididos em três grupos de 18 animais cada um. O primeiro era controle; o segundo com a neoplasia de Ehrlich em sua forma ascítica; e o terceiro na forma subcutânea. Sete dias após a inoculação do tumor, todos os 54 camundongos foram submetidos à laparotomia e reoperados no sétimo dia de pós-operatório, com ressecção da cicatriz e posterior eutanásia. As cicatrizes foram encaminhadas para estudo histológico com técnicas imunoistoquímicas para avaliar Cox-2 (ciclo-oxigenase 2), VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e FGF (fator de crescimento dos fibroblastos) e analisadas de forma semiquantitativa tanto na cicatriz laparotômica como na parede abdominal mais distante do local operado. **Resultados:** Avaliando o peso, observou-se a correta inoculação do tumor e o aumento de peso no grupo com a neoplasia na modalidade ascítica. Os estudos histológicos mostraram que os grupos com a neoplasia apresentaram maior presença da Cox-2 em relação ao controle, estatisticamente significativa. No estudo da Cox-2 da parede abdominal foi o local em que o grupo ascítico apresentou a diferença mais expressiva. O VEGF não apresentou diferenças significantes entre os três grupos, independentemente do local estudado. O FGF teve aumento significativo nos animais com neoplasia. **Conclusão:** Os achados histológicos encontrados tanto na cicatriz das laparotomias quanto na parede abdominal mostraram que com a neoplasia de Ehrlich houve resposta inflamatória exacerbada, traduzida por expressão mais intensa da Cox-2 e maior proliferação fibroblástica, traduzida por expressão mais intensa do FGF, ou seja, estimulou tanto as reações inflamatórias imediatas, observadas nas reações da Cox-2, como nas cicatriciais tardias com os fibroblastos e o FGF.

Correspondência:

Gaspar de Jesus Lopes Filho
E-mail: gasparlopes@uol.com.br

Fonte de financiamento: Fundo Nacional de Saúde – Sistema Nacional de Transplante (SNT)
Conflito de interesse: não há

Recebido para publicação: 24/05/2016
Aceito para publicação: 30/08/2016

HEADINGS - Carcinoma, Ehrlich Tumor, Wound healing, Cyclooxygenase 2. Vascular endothelial growth factor receptor-1, Fibroblast growth factor 2.

ABSTRACT – Background: Healing is an innate biological phenomenon, and carcinogenesis acquired, but with common humoral and cellular elements. Carcinogenesis interferes negatively in healing. **Aim:** To evaluate the histological changes in laparotomy scars of healthy Balb/c mice and with an Ehrlich tumor in its various forms of presentation. **Methods:** Fifty-four mice were divided into three groups of 18 animals. First group was the control; the second had Ehrlich tumor with ascites; and the third had the subcutaneous form of this tumor. Seven days after tumor inoculation, all 54 mice were submitted to laparotomy. All of the animals in the experiment were operated on again on 7th day after surgery, with resection of the scar and subsequent euthanasia of the animal. The scars were sent for histological assessment using immunohistochemical techniques to evaluate Cox-2 (cyclooxygenase 2), VEGF (vascular endothelial growth factor) and FGF (fibroblast growth factor). Semi-quantitatively analysis was done in the laparotomy scars and in the abdominal walls far away from the site of the operation. **Results:** Assessing the weight of the animals, the correct inoculation of the tumor and weight gain in the group with tumoral ascites was observed. The histological studies showed that groups with the tumor showed a statistically significant higher presence of Cox-2 compared to the control. In the Cox-2 analysis of the abdominal wall, the ascites group showed the most significant difference. VEGF did not present any significant differences between the three groups, regardless of the site. The FGF showed a significant increase in animals with the tumor. **Conclusion:** Histological findings in both laparotomy scar and the abdominal wall showed that with Ehrlich's neoplasia there was an exacerbated inflammatory response, translated by more intense expression of Cox-2 and greater fibroblast proliferation, translated by more intense expression of FGF, that is, it stimulated both the immediate inflammatory reactions, observed with Cox-2 reactions, and late scarring by fibroblasts and FGF.

INTRODUÇÃO

Define-se cicatrização como a capacidade do organismo de reparar os tecidos após inflamação^{3,4,13}, e também na substituição de células lesadas e mortas. Ela mostra-se como um fenômeno reparador²², ocorrendo em todas as feridas, procurando restituir a integridade do tecido de forma ordenada e similar. Apresenta pequenas modificações, dependendo do local, do tecido da ferida, e do agente causador^{3,4,13}.

Estudos descrevem cinco fases na cicatrização, iniciando-se com a inflamatória aguda, proliferação celular, formação de tecido conjuntivo, contração e remodelação final da ferida. Estas fases misturam-se e não são individualizadas, ocorrendo juntas e sobrepostas. Outros autores citam quatro fases: limpeza, tecido de granulação, reepitelização e retração^{2,8,10}.

O tecido de granulação é um novo tecido que cresce e preenche o defeito da ferida. Mostra proliferação de fibroblastos e capilares. Os capilares brotam das células endoteliais. A angiogênese mostra-se semelhante na granulação das feridas e na criação de um estroma para as células neoplásicas no crescimento das neoplasias malignas².

No processo de cicatrização vários mediadores são sintetizados na região lesada, os quais modulam a cascata inflamatória na fase inicial do processo de reparo da lesão e na formação da cicatriz definitiva⁷. Destes, a Cox 2 e as citocinas pró-inflamatórias - interleucinas, fatores de crescimento e de necrose tumoral - são fundamentais para a proliferação celular e na síntese da matriz extracelular. As citocinas, agindo em ferimentos e neoplasias malignas, podem reduzir a expressão do p53, regulador da replicação celular^{18,28,31}. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) reduzido diminui a expressão e a síntese proteica, a deposição do colágeno, piorando a cicatrização. Pesquisas mostram que com a introdução do VEGF no tecido celular de animais houve aumento local da vascularização^{29,30}. Vários estudos com tumores sólidos demonstraram a importância do VEGF na angiogênese desses tumores¹. Da reação inflamatória dependem a formação da matriz extracelular e a deposição do colágeno¹¹. Na fase de proliferação celular e formação do tecido conjuntivo, a cicatrização tem aspectos semelhantes aos observados em algumas neoplasias.

O objetivo deste trabalho foi estudar comparativamente as alterações histológicas nas cicatrizes de laparotomias em camundongos sadios e com a neoplasia de Ehrlich em suas diferentes formas de apresentação.

MÉTODOS

O experimento obedeceu os princípios éticos de experimentos com animais, Lei n. 11794 de 08 de outubro de 2008, e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Unifesp sob número 2009/09.

Desenho do estudo

Foram estudados três grupos com 18 animais cada: grupo controle (C); grupo com introdução de célula do tumor de Ehrlich no peritônio^{6,9,12,26} (A); e grupo onde a mesma célula era introduzida no tecido celular subcutâneo da coxa esquerda (D). A introdução da célula maligna nos dois modelos propostos foi realizada conforme trabalho original desenvolvido em 1896 e publicado em 1906 por Paul Ehrlich⁹, e seguida em outros modelos de pesquisa^{6,12,26}. Utilizou-se camundongos fêmeas Balb C com nove semanas, 20 g, mantidas no biotério em gaiolas individuais, em temperatura constante entre 20-24°C, 12 h no ciclo dia/noite, e umidade de 50-60%. Os animais eram avaliados diariamente e pesados em quatro momentos do experimento. Sete dias após a introdução da célula tumoral ou de ácido tampão salino no grupo controle, todos os 54 animais foram submetidos à laparotomia mediana. Após uma semana eram

novamente operados com a ressecção da parede abdominal anterior, incluindo a cicatriz cirúrgica. Todos os espécimes eram enviados para estudo histológico.

Inoculação de células neoplásicas

As células neoplásicas com 92% de viabilidade celular (contadas na câmara de Neubauer) foram fornecidas pela Escola Veterinária da Universidade. A solução (0,4 ml) foi injetada no peritônio (no quadrante inferior esquerdo do abdome) ou na camada subcutânea da coxa esquerda (perna traseira) dos ratos (lateral externa regional).

Procedimento cirúrgico, cuidados pós-operatórios e eutanásia

A anestesia por via intramuscular foi feita com xylasina e ketaminana dose de 50 mg/kg, ambas. Todos os animais foram submetidos à laparotomia mediana com inspeção do conteúdo abdominal, sem esvaziamento da ascite, observada no grupo A. A parede abdominal era fechada em dois planos com pontos separados de mononylon 5-0 com 0,6 cm aparte um do outro aproximadamente. O primeiro plano envolveu a parede - peritônio, a aponeurose e os músculos. O segundo, o tecido subcutâneo e a pele. Foi utilizado como analgésico o cloridrato de tramadol 1 mg/kg de 12/12 h por três dias no pós-operatório imediato, adicionado na água dos animais²⁰. Os animais foram colocados de volta em suas gaiolas 30 min após a operação. A ferida cirúrgica foi mantida exposta, sem curativos.

Sete dias após a primeira operação, os animais foram mortos com dosagens quadruplicadas dos fármacos utilizados na anestesia. A cicatriz cirúrgica e os tecidos ao redor foram removidos em bloco para análise histológica, medindo aproximadamente 3 cm de extensão, a partir do processo xifóide.

Análise histológica

Foi realizada na cicatriz cirúrgica e na parede abdominal, distante da cicatriz, nos três grupos de maneira uniforme. As lâminas foram montadas com cortes de 5 µm de espessura, submetidas à coloração de H&E e tricômico da Masson, e também ao estudo imunoistoquímico para a pesquisa de Cox-2, VEGF e FGF (fator de crescimento dos fibroblastos). Na imunoistoquímica foi usada para a detecção de ciclo-oxigenase 2, Cox-2 SP21, clone Spring M3214, diluído a 1/250; para o fator de crescimento endotelial vascular o VEGF C-1, clone Santa Cruz SC7269, diluído a 1/100; e para fibroblasto fator de crescimento, FGF2, 147 clone de Santa Cruz, diluído a 1/1500. Foram realizadas avaliações semiquantitativas nos três parâmetros, expressos como +, ++ e +++, do menos para o mais intenso^{14,16,20}.

Análise estatística

Foi utilizado o teste t de Student para avaliação do peso dos animais, dentro de cada grupo. Para a análise entre os três grupos, utilizou-se o teste de Anova e Tukey. Na análise dos parâmetros histológicos utilizou-se o teste binomial, para testar as diferenças entre proporções amostrais independentes. Utilizou-se o software BioEstat, versão 5.0, na análise estatística, considerando como significantes p-valores iguais ou inferiores a 0,05.

RESULTADOS

Não houve óbitos entre os 54 animais do experimento. Na avaliação do peso, o grupo com ascite teve ganho de forma significativa ($p < 0,05$, Figura 1). As técnicas de H&E e tricômico de Masson conseguiram identificar a cicatriz cirúrgica com precisão (Figura 2A). Na avaliação do Cox-2, dentro da cada grupo, observou-se que no grupo A houve diferença significativa entre os dados da parede abdominal e cicatriz cirúrgica ($p < 0,05$, Figuras 2B e 2C).

DISCUSSÃO

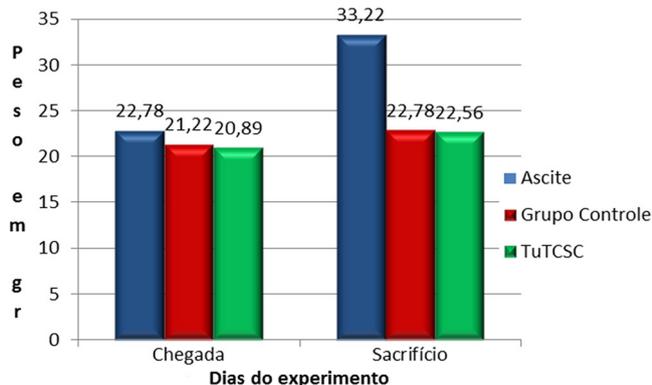


FIGURA 1 - Peso na chegada e reoperação nos três grupos

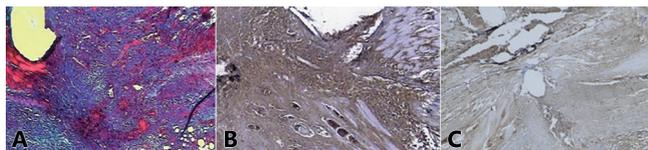


FIGURA 2 - Cicatriz cirúrgica: A) tricrômico de Masson, grupo D, 40x; B) Cox-2, grupo A, 40x, +++; C) Cox-2, grupo A, 40x, ++

Comparando os três grupos na parede abdominal houve diferença significativa entre os grupos A, D e C ($p < 0,05$), com maior expressão no grupo A, em relação ao D, e deste com relação ao C.

Na avaliação da cicatriz cirúrgica, os grupos A e D - com a célula tumoral - não apresentaram diferença significativa entre eles ($p > 0,05$), mas foram maiores quando comparados com o grupo C ($p < 0,05$).

A análise com VEGF não demonstrou diferenças entre os três grupos estudados, na cicatriz cirúrgica ou na parede abdominal ($p > 0,05$, Figura 3).

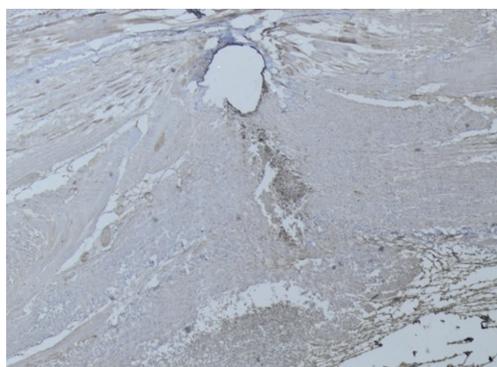


FIGURA 3 - VEGF, grupo A, 40x, ++

A análise com o FGF demonstrou que as cicatrizes dos animais com neoplasia apresentavam diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,05$). Os grupos com neoplasia, quando comparados entre si, não apresentaram diferença ($p > 0,05$, Figuras 4A e 4B).

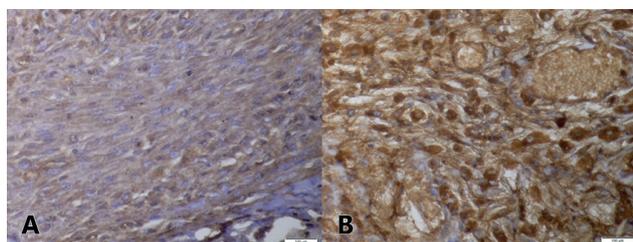


FIGURA 4 - A) FGF, grupo D, 400x, ++; B) FGF, grupo A, 400x, +++

A avaliação exclusiva da cicatriz foi prejudicada no grupo A em razão da invasão na cicatriz por células neoplásicas presentes na ascite. Foi o grupo onde a neoplasia teve evolução mais rápida, com evidente piora dos animais pela ascite e pelos sintomas por ela induzidos. Avaliou-se também a parede abdominal distante da cicatriz.

A Cox-2 é uma enzima envolvida na resposta inflamatória expressando-se também nos mecanismos de divisão celular dos tumores malignos, onde tem importante papel. Aumenta nos processos de carcinogênese, quando existem citocinas, fatores de estímulo e de crescimento tumoral; e agindo associada às células tumorais neoplásicas, pode regular o crescimento inicial destas células, sua proliferação, invasão, migração, os fenômenos angiogênicos e por fim a apoptose e morte programada das células^{19,21,27}. A expressão da Cox-2 mostrou-se intensa, no nível máximo, na maioria das cicatrizes dos animais com neoplasia, grupos A e D. No grupo C sua expressão foi menor.

A angiogênese é fator biológico fundamental para a malignidade e progressão tumoral. Os capilares brotados das células endoteliais formam e irrigam um estroma para o crescimento das células neoplásicas. Ela consiste na formação de novos vasos, sendo guiada por fatores celulares como macrófagos, mastócitos, plaquetas, fibroblastos e células neoplásicas que produzem mais de uma dezena de fatores que interferem no processo, com destaque para o VEGF, o FGF, e os fatores de crescimento e transformação β ^{15,24}.

O VEGF induz a proliferação celular, a migração celular, o desenvolvimento embrionário, a diferenciação celular, a angiogênese e a transformação maligna. O estudo das cicatrizes neste experimento, que mostrou diferenças na fase inflamatória, avaliada pela Cox-2, não se repetiu na avaliação do VEGF. Ele, em toda a parede abdominal, mostrou-se idêntico nos três grupos estudados. Nem a infiltração tumoral da parede abdominal por tumor, observada no grupo A produziu diferenças neste achado

O FGF é um membro da família dos fatores de crescimento que estimulam a proliferação de células do mesênquima e do epitélio. Estimula o crescimento e maturação dos fibroblastos, em conjunto com outras citocinas. Neste estudo a sua avaliação esteve aumentada nos grupos com neoplasia, maior que no grupo controle. Observou-se que todas as condições foram criadas para que o fibroblasto tivesse maior expressão nos grupos com neoplasia^{17,23}.

A cicatrização estudada e dividida em fases, com fenômenos humorais, vasculares e celulares, não deve ser avaliada de forma estanque e fracionada. Os fenômenos acontecem simultaneamente, se autorregulam e interferem um no outro. Separar citocinas de células, fases humorais e inflamatórias das celulares é impossível, sendo esta interação fundamental para o processo cicatricial propriamente dito e seu perfeito entendimento.

Neste trabalho, a análise conjunta de todas as variáveis demonstra a possível interferência do processo neoplásico na cicatriz operatória, após a constatação da expressão aumentada da Cox-2 nos tecidos examinados da cicatriz e áreas próximas, assim como do FGF.

CONCLUSÃO

Os achados histológicos encontrados tanto na cicatriz das laparotomias quanto na parede abdominal mostraram que com a neoplasia de Ehrlich houve resposta inflamatória exacerbada, traduzida por expressão mais intensa da Cox-2 e maior proliferação fibroblástica, traduzida por expressão mais intensa do FGF, ou seja, estimulou tanto as reações inflamatórias imediatas, observadas nas reações da Cox-2, como nas cicatrizes tardias com os fibroblastos e o FGF.

REFERÊNCIAS

- Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M. S., Ehrlich, H. P., Brem, H., 2009. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J. Surg. Res.* 153(2), 347-358.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., Tomic-Canic, M., 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound. Repair. Regen.* 16(5), 585-601.
- Bogden, A.E., Moreau, J.P., Eden, P.A., 1997. Proliferative response of human and animal tumours to surgical wounding of normal tissues: onset, duration and inhibition. *Br. J. Cancer.* 75(7), 1021-1027.
- Braiman-Wiksmann, L., Solomonik, I., Spira, R., Tennenbaum, T., 2007. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicol. Pathol.* 35, 767-779.
- Brattwall, M., Turan, I., Jakobsson, J., 2010. Pain management after elective hallux valgus surgery: a prospective randomized double-blind study comparing etoricoxib and tramadol. *Anesth. Analg.* 111(2), 544-549.
- Culo, F., Allegretti, N., Marusić, M., 1978. Ascitic versus solid growth of Ehrlich ascites tumor influenced by immunological factors. *Oncology.* 35(1), 15-21.
- Dubay, D. A., Wang, X., Kuhn, M. A., Robson, M. C., Franz, M. G., 2004. The prevention of incisional hernia formation using a delayed-release polymer of basic fibroblast growth factor. *Ann. Surg.* 240(1), 179-186.
- Efron, D.T., Most, D., Shi, H.P., Tantry, U.S., Barbul, A., 2001. A novel method of studying wound healing. *J. Surg. Res.* 98(1), 16-20.
- Ehrlich P., 1906. Experimentally Carcinomstudien an mouse. *Arb. Inst. Ther. Frankfurt*, 1:78-80.
- Falanga, V., 1993. Wound healing. An overview. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 19(8), 132-139.
- Folkman, J., 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug. Discov.* 6(4), 273-286.
- Gordon, C. R., Rojavin, Y., Patel, M., Zins, J.E., Grana, G., Kann, B., Simons, R., Atabek, U., 2009. A review on bevacizumab and surgical wound healing: an important warning to all surgeons. *Ann. Plast. Surg.* 62(6), 707-709.
- Gottrup, F., Agren, M., Karlsmark, T., 2000. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound. Repair. Regen.* 8, 83-96.
- Hasima, R., Whipple, M. E., Martin, L. E., Kuo, W. P., Ohno-Machado, L., Lingen, M. W., 2008. Angiogenic heterogeneity in head and neck squamous cell carcinoma: biological and therapeutic implications. *Lab. Invest.* 88(4), 342-353.
- Hendriksen, E. M., Span, P. N., Schuurin, J., Peters, J. P., Sweep, F. C., van der Kogel, A. J., Bussink, J., 2009. Angiogenesis, hypoxia and VEGF expression during tumour growth in a human xenograft tumour model. *Microvasc. Res.* 77(2), 96-103.
- Henriques, A. C., de Matos, F. R., Galvão, H. C., Freitas, Rde. A., 2012. Immunohistochemical expression of MMP-9 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue. *J. Oral. Sci.* 54(1), 105-111.
- Ishigaim, T., Hida, Y., Matsudate, Y., Murao, K., Kubo, Y., 2010. The involvement of fibroblast growth factor receptor signaling pathways in dermatofibroma and dermatofibrosarcomaprotuberans. *J. Med. Invest.* 60(1-2), 106-113.
- Kankanala, J., Latham, A. M., Johnson, A. P., Homer-Vanniasinkam, S., Fishwick, C. W., Ponnambalam, F., 2012. A combinatorial in silico and cellular approach to identify a new class of compounds that target VEGFR2 receptor tyrosine kinase activity and angiogenesis. *Br. J. Pharmacol.* 166(2), 737-748.
- Kennedy, D. O., Kojima, A., Yano, Y., Hasuma, T., Otani, S., Matsui-Yuasa, I., 2001. Growth inhibitory effect of green tea extract in Ehrlich ascites tumor cells involves cytochrome c release and caspase activation. *Cancer. Lett.* 166(1), 9-15.
- Kim, H.S., Lee, H.S., Kim, W.H., 2011. Clinical significance of protein expression of cyclooxygenase-2 and somatostatin receptors in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer. Res. Treat.* 43(3), 181-188.
- Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C., Stallings, W. C., 1996. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature.* 384(6610), 644-648.
- Li, J., Chen, J., Kirsner, R., 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol.* 25(1), 9-18.
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., Locati, M., 2013. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* 229(2), 176-185.
- Okuno, Y., Nakamura-Ishizu, A., Kishi, K., Suda, T., Kubota, Y., 2011. Bone marrow-derived cells serve as proangiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing. *Blood.* 117(19), 5264-5272.
- Rosmorduc, O., Housset, C., 2010. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin. Liver. Dis.* 30(3), 258-270.
- Salgado, F. L., Lopes Filho, G. J., de Moura, L. A., 2009. Effect of experimental ehrlich ascites tumors on healing of abdominal wall wounds in mice. *Wounds.* 21(10), 262-266.
- Souza, C., Carvalho, L. F., Ferreira, M. A. N. D., Pesquero, J. L., Cassali, G. D., 2012. Kint3-4 promove apoptose e inibição da angiogênese no tumor sólido de Ehrlich [Kint3-4 promotes apoptosis and inhibition of angiogenesis in solid Ehrlich Tumor]. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 64(3), 776-780.
- Strieter, R. M., Polverini, P. J., Arenberg, D. A., Walz, A., Opdenakker, G., Van Damme, J., Kunkel, S. L., 1995. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J. Leukoc. Biol.* 57(5), 752-762.
- Toomey, D. P., Murphy, J. F., Conlon, K. C., 2009. COX-2, VEGF and tumour angiogenesis. *Surgeon.* 7(3), 174-180.
- Trinh, X. B., van Dam, P. A., Vermeulen, P. B., Van Laere, S. J., Van den Eynden, G. G., Tjalma, W. A., Dirix, L. Y., 2011. VEGF-A-independent and angiogenesis-dependent tumour growth in patients with metastatic breast cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 13(11), 805-808.
- Whitte, M. B., Barbul, A., 1997. General principles of wound healing. *Surg. Clin. North. Am.* 77(3), 509-528.