

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

Daniel de Albuquerque Rangel Moreira

**Transplante hepático *large-for-size* porcino com
modulação do fluxo venoso portal: estudo
hemodinâmico, histológico e biomolecular**

São Paulo

2015

Daniel de Albuquerque Rangel Moreira

**Transplante hepático *large-for-size* porcino com
modulação do fluxo venoso portal: estudo
hemodinâmico, histológico e biomolecular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Daniel de Albuquerque Rangel

Transplante hepático *large-for-size* porcino com modulação do fluxo venoso portal : estudo hemodinâmico, histológico e biomolecular / Daniel de Albuquerque Rangel Moreira. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientadora: Ana Cristina Aoun Tannuri.

Descritores: 1.Transplante de fígado 2.Fluxo sanguíneo regional 3.Porcinos
4.Traumatismo por reperfusão 5.Fígado/enzimologia 6.Hemodinâmica
7.Tamanho do órgão

USP/FM/DBD-430/15

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Pediátrica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM 30) e no Laboratório de Investigação Médica em Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental (LIM 26) da FMUSP.

O projeto foi aprovado na Comissão de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 30/05/2012, sob número 123/12.

Os recursos financeiros foram obtidos através da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do processo número 2012/13020-7 – São Paulo, Brasil.

À Ana Carolina, pelo
amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria de Fátima de Albuquerque e Antônio Rangel Moreira, pelos momentos que estive ausente e distante do convívio familiar, por servirem como exemplo de perspicácia e energia incessantes para minha vida.

À Profa. Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri, minha orientadora, por ser minha guia e exemplo no mundo científico e acreditar e estimular o desenvolvimento deste projeto participando ativamente de todas as suas etapas.

Ao Prof. Dr. Uenis Tannuri, pelo ensino de valores inestimáveis ao médico cirurgião e ao ser humano, pelo incentivo e importantes contribuições para a execução desta tese.

Ao Dr. Alessandro Rodrigo Belon, sua dedicação e competência com os cuidados dos animais foram fundamentais para a realização dos experimentos.

Ao Sr. Raimundo Renato Nunes Guimarães, que com sua presença efetiva e colaboração nos experimentos muito contribuiu para a elaboração desta tese.

À Srta. Maria Cecília de Mendonça Coelho, pela presteza, competência e dedicação na execução dos estudos de biologia molecular.

Às Srtas. Josiane de Oliveira Gonçalves e Suellen Serafini, pelo preparo do material histológico e de biologia molecular.

À Dra. Maria Mercês Santos, por todos os ensinamentos, pelo cuidado e ternura dispensado aos nossos pacientes e por sempre estar ao meu lado em todas as situações.

À Sra. Patrícia Lopes Pereira, pela solicitude, presteza e objetividade em todas as fases da elaboração desta tese.

À Dra. Fabiana Roberto Lima, pelas orientações e atenção na avaliação histológica.

Aos funcionários da Técnica Cirúrgica da FMUSP, Sra. Junko Takano Osaka, Sr. Ourisvaldo Santana Santos, Sr. Cláudio Antônio Vidotti, Sr. Elias Aparecido Marcelino, Sra. Dulcinéia Mariano, Sra. Vanda de Almeida Novaes e Sra. Lucileide Garces Ferreira, pela ajuda na manipulação dos animais e pelo preparo do instrumental cirúrgico, tornando possível o desenvolvimento dessa tese.

Ao amigo, Dr. Antônio José Gonçalves Leal, pelos ensinamentos através de exemplos profissionais e de vida.

Às amigas da residência de Cirurgia Pediátrica, Dra. Marina de Assis Galvão Bueno, Dra. Roberta Figueiredo Monteiro, Dra. Julyanna Duarte Lira e Dra. Ana Caroline Dantas Marques, pela compreensão e apoio na realização dos experimentos e no cuidado com nossos pacientes.

A todos da Disciplina de Cirurgia Pediátrica e Transplante Hepático do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Manoel Carlos Pietro Velhote, Dr. Ali Abdul Rahman Ayoub, Dr. Marcos Marques da Silva, Dr. João Gilberto Maksoud Filho, Dr. Nelson Elias Mendes Gibelli, Dr. Wagner de Castro Andrade, Dr. Fábio de Barros, Dr. Luiz Roberto Schlaich Ricardi, pelas lições recebidas no convívio e pela grande contribuição em minha formação profissional.

“Devo ensinar-lhe, Tzu-lu, no que consiste o conhecimento? Quando você sabe alguma coisa, reconhecer que sabe; e, quando você não sabe alguma coisa, reconhecer que não sabe. Isso é conhecimento.”

(Confúcio, Séc. IV A.C.)

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	14
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 AMOSTRA	17
3.1.1 <i>Considerações Éticas</i>	17
3.1.2 <i>Receptor</i>	17
3.1.3 <i>Doador</i>	18
3.2 MÉTODOS DE AVERIGUAÇÃO.....	18
3.2.1 <i>Procedimento Anestésico</i>	18
3.2.2 <i>Procedimento Cirúrgico do Doador</i>	19
3.2.3 <i>Cirurgia da Bandeja</i>	23
3.2.4 <i>Cirurgia do Receptor</i>	24
3.3 MÉTODOS DE ANÁLISE	30
3.3.1 <i>Análise dos Procedimentos e Animais</i>	30
3.3.2 <i>Análise Hemodinâmica e Metabólica Hepática</i>	31
3.3.3 <i>Análise Histológica</i>	32
3.3.4 <i>Análise Imunoistoquímica</i>	33
3.3.5 <i>Análise Molecular</i>	35
3.3.5.1 <i>Extração de ARN</i>	35
3.3.5.2 <i>Transcrição Reversa</i>	36
3.3.5.3 <i>Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa Quantitativa (qRT-PCR)</i>	37
3.3.6 <i>Análise Estatística</i>	40
4 – RESULTADOS	42
4.1 ANÁLISE DOS PROCEDIMENTOS	43
4.2 RESULTADOS DO FLUXO VENOSO PORTAL	48
4.3 RESULTADOS DO FLUXO ARTERIAL HEPÁTICO	50
4.4 RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA	51
4.5 RESULTADOS DA ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	53
4.6 RESULTADOS DA ANÁLISE MOLECULAR.....	53
5 – DISCUSSÃO	58
6 – CONCLUSÕES.....	70
7 – ANEXOS	73
8 – REFERÊNCIAS	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanina aminotransferase
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
ARN	Ácido ribonucléico
AST	Aspartato aminotransferase
AVB	Atresia das vias biliares
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK	Célula de Kupffer
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
eNOS	Óxido-nítrico sintetase endotelial
ePTFE	<i>Expanded Polytetrafluoroethylene</i>
FC	Frequência cardíaca
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GBWR	<i>Graft to body weight ratio</i>
GIM	<i>Graft Inflow Modulation</i>
HE	Hematoxilina-eosina
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
LIR	Lesão de isquemia/reperfusão

LFS	<i>Large-for-size</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
nNOS	Óxido-nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico-sintase
PAM	Pressão arterial média
PCI	Pré-condicionamento isquêmico
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Cloreto de polivinila
rFVP	Razão de fluxos venosos portais
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
TNF	<i>Tumoral necrosis fator</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspecto do hilo hepático após dissecação antes da aferição de fluxos (A), * artéria hepática, † veia porta; Colocação do sensor de fluxo na artéria hepática (B).....	20
Figura 1 – (cont.) Colocação do sensor de fluxo na veia porta (C).....	21
Figura 2 - Colocação do cateter na veia esplênica, para infusão da solução de preservação (A); e na aorta infra-renal (B).....	22
Figura 3 – Abertura da cavidade do receptor	25
Figura 4 - Anastomose da veia porta do receptor com a veia porta do enxerto	26
Figura 5 – Aspecto final das anastomoses portal, arterial e da veia cava inferior	27
Figura 6 – <i>Shunt</i> mesentérico-cava antes do transplante hepático (A) e desenho esquemático (B).....	28
Figura 7 – Campo histológico corado por HE mostra inflamação lobular grau 3 (A) e necrose grau 3 (B).....	33
Figura 8 – Aspecto de lâmina da imunohistoquímica (TUNEL) no grupo CTRL (esquerda) e no grupo LFS (direita)	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Pesos dos doadores e receptores separados por grupos.....	43
Gráfico 2 – Razão do enxerto pelo peso corporal do animal (GBWR) entre os grupos.....	44
Gráfico 3 – Pesos do enxerto por grupos.....	45
Gráfico 4 – AST e ALT dos animais receptores por grupo.....	47
Gráfico 5 – pH arterial dos animais doadores e receptores.....	47
Gráfico 6 – Fluxo venoso portal nos doadores e receptores.....	48
Gráfico 7 – Fluxo venoso portal dos receptores após o transplante por grupo em relação a média (linha vermelha).....	49
Gráfico 8 – Fluxo venoso portal por grupo, diferença entre doadores e receptores.....	49
Gráfico 9 – Razão do fluxo venoso portal por grupo.....	50
Gráfico 10 – Fluxo arterial hepático por grupo.....	51
Gráfico 11 – Gráfico de pontos e modelo de regressão linear ajustado (linha vermelha) dos genes relacionados a apoptose e da razão de fluxos venosos portais (rFVP) como variável independente.....	55
Gráfico 12 – Gráfico de pontos e modelo de regressão linear ajustado (linha vermelha) do gene da IL-6 e da razão de fluxos venosos portais (rFVP) como variável independente. <i>Outliers</i> marcados com seta.....	56
Gráfico 13 – Intensidade da expressão dos genes relacionados a produção do Óxido Nítrico.....	56
Gráfico 14 – Gráfico de pontos e modelo de regressão linear ajustado (linha vermelha) dos genes eNOS (endotelial nitric oxide synthase), iNOS (inducible nitric oxide synthase), ICAM (intercellular adhesion molecule/CD54), TNF- α e da razão de fluxos venosos portais (rFVP) como variável independente.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados para realização do RT-PCR.....	38
Tabela 2 – Características ponderais dos animais	43
Tabela 3 – Características metabólicas e bioquímicas dos procedimentos	46
Tabela 4 – Média do fluxo arterial hepático por grupo (mL/min).....	51
Tabela 5 – Resultado da análise histológica	52
Tabela 6 – Resultado da contagem de núcleos TUNEL (+).....	53
Tabela 7 – Análise dos resultados da biologia molecular.....	54

RESUMO

MOREIRA DAR. *Transplante hepático large-for-size porcino com modulação do fluxo venoso portal: estudo hemodinâmico, histológico e biomolecular* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: O tamanho ideal do fígado varia entre 0,8% a 4% do peso do receptor (*graft to body weight ratio* – GBWR). Em crianças com menos de 10 kg submetidas a transplante hepático com doador vivo encontramos frequentemente uma situação denominada *large-for-size*, que ocorre ao se implantar um enxerto com peso maior que 4% do peso corpóreo do receptor. A lesão de isquemia/reperfusão (LIR) é uma resposta inflamatória mediada pelas células de Kupffer, principais responsáveis pela liberação de espécies reativas de oxigênio no parênquima hepático. Além disso, a célula de Kupffer libera citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6 que recrutam polimorfonucleares sistêmicos e linfócitos T-CD4+ perpetuando a lesão mesmo após o fluxo sanguíneo estar restabelecido. O hipofluxo portal pode piorar a LIR na situação *large-for-size*. Desta forma, um *shunt* mesentérico-cava tentando direcionar o fluxo para a veia porta poderia ser benéfico nesta situação. **MÉTODOS:** Dezesesseis porcos Landrace-Largewhite pesando entre 17 – 38 kg foram submetidos a transplante de fígado. Foram distribuídos em três grupos: controle (CTRL), *large-for-size* (LFS) e *shunt* (SHUNT). Foi aferido o fluxo venoso portal, arterial hepático e colhido material para estudo histológico e biomolecular uma hora após a reperfusão. A relação entre o fluxo venoso portal do receptor para o fluxo venoso portal doador (rFVP) foi utilizada para se correlacionar com a gravidade da isquemia/reperfusão. Foram realizadas biópsias uma hora após o transplante para microscopia óptica e TUNEL além de quantificar a expressão dos genes da iNOS, eNOS, IL-6, BAX e BCL, c-fos/c-jun, ICAM e TNF- α . **RESULTADOS:** O GBWR foi maior nos grupos LFS e SHUNT (3,45 vs. 5,06 e 6,03; $p=0,009$). Quando comparamos isoladamente receptores e doadores por grupo houve diferença no fluxo portal somente nos grupos LFS (890 ± 203 mL / min vs. 458 ± 119 mL / min, $p=0,0034$) e SHUNT ($1003 \pm 5,3$ mL/min vs. 495 ± 277 mL/min; $p=0,0031$). A rFVP foi próxima de 1 no grupo CTRL e significativamente maior que nos grupos LFS e SHUNT ($p=0,03$). O fluxo arterial hepático foi significativamente menor no grupo SHUNT ($62,16 \pm 31$ mL / min) quando comparado com grupo CTRL ($140,4 \pm 53,88$ mL / min) e LFS ($142 \pm 55,41$ mL / min), $p=0,02$. A IL-6 e BAX foram menos expressas no grupo CTRL ($p=0,05$ e $p=0,002$). Houve uma relação linear entre a expressão dos genes BAX, TNF- α e eNOS com a rFVP ($p=0,02$; $p=0,02$ e $p=0,009$ respectivamente). Na avaliação histológica observou-se índice de isquemia e reperfusão semelhante entre os grupos CTRL e SHUNT mas menor em relação ao LFS, 3, 3,5 e 7 respectivamente ($p=0,04$). **CONCLUSÕES:** O transplante *large-for-size* acarreta hipofluxo portal relativo, e isto pode estar relacionado a um maior dano hepatocitário com acentuação da lesão de isquemia-reperfusão. A presença de um *shunt* entre a veia cava inferior e a veia mesentérica superior não conseguiu aumentar o influxo de sangue para o fígado de maneira persistente e pode estar implicado na diminuição do fluxo arterial hepático. No entanto, o aumento temporário do influxo portal pode estar relacionado a atenuação de algumas características da LIR no transplante *large-for-size*.

Descritores: transplante de fígado; fluxo sanguíneo regional; porcos; traumatismo por reperfusão; fígado/enzimologia; hemodinâmica; tamanho do órgão.

ABSTRACT

MOREIRA DAR. *Large-for-size liver transplantation in pigs with modulation of portal venous flow: a hemodynamic, histological and biomolecular study* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

INTRODUCTION: The optimum size of the liver graft for transplantation varies between 0.8% and 4% of the weight of the recipient (graft to body weight ratio - GBWR). In children with less than 10 kg who undergo liver transplantation with living donor a disorder called large-for-size (LFS) often occurs, when a graft weighing more than 4% of body weight of the recipient is implanted. Ischemia / reperfusion injury (IRI) is an inflammatory response mediated by Kupffer cells, mainly responsible for the release of reactive oxygen species in the liver parenchyma. In addition, Kupffer cells releases proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 and IL-6 that recruit systemic polymorphonuclear cells and T-CD4 + perpetuating this injury even after the blood flow is restored. Low portal flow may worsen IRI in LFS situation. So, a mesocaval shunt directing the flow to portal vein should be beneficial in this condition. **METHODS:** Sixteen Landrace/Largewhite pigs weighing approximately 20 kg (17-38 kg) underwent liver transplantation. They were divided into three groups: control (CTRL), large-for-size (LFS) and shunt (SHUNT). Portal venous flow was measured and liver and blood collected for histological and biomolecular study one hour after reperfusion. The relationship between the portal venous flow from the recipient to the donor portal venous flow (rFVP) was used to establish correlations with the parameters of ischemia and reperfusion. Biopsies were performed one hour after transplant to assess ischemia/reperfusion injury, TUNEL and quantify the following genes expression: iNOS, eNOS, IL-6, BAX and BCL c-fos / c-jun, ICAM, and TNF- α . **RESULTS:** GBWR was higher in groups LFS and SHUNT than CTRL (3.45 vs. 5.06 and 6.03; $p=0.009$). When compared separately by group recipients and donors difference in portal flow was observed only in LFS groups (890 ± 203 mL / min vs. 458 ± 119 mL / min, $p=0.0034$) and SHUNT (1003 ± 5.3 mL / min vs. 495 ± 277 mL / min, $p=0.0031$). rFVP was close to 1 in the CTRL group and significantly higher than the LFS and SHUNT groups ($p=0.03$). Hepatic artery blood flow was significantly lower in SHUNT group (62.16 ± 31 mL / min) compared with CTRL group (140.4 ± 53.88 mL / min) and LFS (142 ± 55.41 mL / min), $p=0.02$. IL-6 and BAX were expressed less in the CTRL group ($p=0.05$ and $p=0.002$). There was a linear relationship between the BAX, TNF- α and eNOS with rFVP ($p=0.02$, $p=0.02$ and $p=0.009$ respectively). Histological evaluation showed similar ischemia-reperfusion index between CTRL and SHUNT groups but lower values in compare to LFS group, 3, 3.5 and 7 respectively ($p=0.04$). **CONCLUSIONS:** The large-for-size liver transplantation leads to a relative low portal venous flow and this can be related to greater hepatocyte damage with accentuation of ischemia-reperfusion injury. The presence of a shunt between the inferior vena cava and the superior mesenteric vein could not increase the inflow of blood to the liver persistently and may be implicated in decreased hepatic artery blood flow. However, the temporary increase in portal inflow may be related to mitigation of some characteristics of IRI in large-for-size liver transplantation.

Descriptors: liver transplantation; regional blood flow; swine; reperfusion injury; liver/enzymology; hemodynamics; organ size.

1 – Introdução

O transplante ortotópico de fígado é uma modalidade terapêutica universalmente aceita para tratamento das hepatopatias progressivas não passíveis de tratamento clínico. Atualmente, com os avanços dos cuidados nos centros de terapia intensiva pediátricos e melhora das técnicas anestésicas e cirúrgicas, o transplante hepático passou de um procedimento experimental de exceção a terapêutico com taxas de sobrevida de cerca de 90% em 1 ano(1, 2). As principais causas de doença hepática terminal na criança passíveis de transplante hepático podem ser divididas em: erros inatos do metabolismo (p. ex. deficiência de alfa-1 antitripsina, doença de Wilson), moléstias colestáticas (p. ex. atresia das vias biliares, síndrome de Alagille), lesão hepato-biliar (p. ex. hepatite viral, hepatite auto-imune) e tumores (p. ex. carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma, hemangioendotelioma), sendo a causa mais comum de indicação de transplante hepático a atresia das vias biliares (AVB)(3).

A AVB é uma doença de etiologia não conhecida que desencadeia um processo inflamatório progressivo dos ductos biliares com conseqüente cirrose biliar secundária e falência hepática. Corresponde a cerca de 50% a 70% das indicações de transplante hepático na população pediátrica, e a necessidade de substituição do fígado, na maior parte das vezes, ocorre antes dos 12 meses de vida sendo conseqüentemente em crianças com peso abaixo dos 10 kg. Quando não tratada a doença leva a morte da maioria destes pacientes em torno dos 18 a 24 meses de vida.

A atresia das vias biliares acomete a criança no período em que ela cresce mais rapidamente dificultando a absorção e metabolização de nutrientes e assim apresenta-se quase sempre com desnutrição grave.

Apesar de inicialmente o transplante hepático ter sido realizado com enxertos hepáticos de doadores cadavéricos de tamanho compatível com o receptor, logo ficou clara a necessidade de se ampliar o número de doadores e isso foi possível por meio de

inovações técnicas – reduzindo-se o tamanho do fígado de acordo com sua anatomia segmentar. Desta forma partes do órgão podiam ser implantadas em pacientes menores sem incompatibilidade de tamanho.

As técnicas de redução *ex situ* do fígado descritas por Bismuth e Houssin(4) foram postas em prática na década de 80 e posteriormente se tornaram padrão em todo mundo, ainda sendo utilizadas atualmente. Na grande maioria das vezes usamos o segmento lateral esquerdo (segmento II e III de Coinaud) ou o lobo esquerdo (segmentos II-IV de Coinaud).

Na década de 90 os refinamentos técnicos e a experiência ao longo da década anterior permitiram a realização de divisões do fígado – *in-situ* ou *ex-situ* – de maneira que o mesmo poderia ser utilizado em dois receptores distintos (*split liver*). Apesar de relatos mostrarem melhora nos índices de oferta de órgãos, os resultados iniciais foram questionáveis em relação a sobrevida do enxerto e morbidade, o que melhorou após o treinamento das equipes e o advento da divisão *in situ*. Isto, no entanto, se apresenta de difícil execução do ponto de vista logístico tendo adquirido um papel secundário como meio de se aumentar a oferta de órgãos para transplante.

O transplante hepático com doador vivo foi desenvolvido seguindo-se a constante necessidade de uma demanda crescente de enxertos para transplantes na Europa, América do Norte e Japão. Neste último, o conceito de morte encefálica não era reconhecido até recentemente, o que deixou como única opção para as crianças os enxertos oriundos de doadores vivos. No mundo, o primeiro caso com sucesso descrito desta modalidade de transplante foi realizado por Raia *et al* em 1984 em uma criança de 19 meses de vida a qual recebeu um enxerto hepático de um doador de 40 anos(5).

Durante este período inicial de desenvolvimento técnico do transplante hepático um dos fatores preponderantes nas avaliações dos enxertos era a razão entre o volume do

enxerto e da cavidade abdominal do receptor. Após a saída do transplante hepático do grupo de procedimentos experimentais, foi possível realizar estudos mais abrangentes que observaram principalmente em receptores adultos que enxertos muito pequenos ou grandes para o tamanho do receptor apresentavam maiores índices de morbidade, mortalidade e perda do enxerto.

O peso do fígado corresponde a 2,5% do peso corporal total. No entanto, recebe cerca de 100 a 130 mL / min por 100 g de massa hepática que significa 25% do débito cardíaco. Cerca de 10 a 15% do volume sanguíneo total do organismo está contido no fígado sendo 60% nos sinusóides hepáticos e 10% nos grandes vasos, veia porta e veias hepáticas. Metade deste volume pode ser rapidamente extraído do fígado de forma ativa ou passiva, transformando-o em um importante reservatório sanguíneo. O aporte sanguíneo é feito através da artéria hepática que supre 25% ou 30 mL / min / 100g de fígado e pela veia porta 75% ou 90 mL / min / 100g de fígado. Com este fluxo sanguíneo a artéria hepática é capaz de contribuir com até 50% das necessidades de O₂ do parênquima hepático e a veia porta de 50 a 70% do aporte de O₂ para o fígado. O sangue venoso portal flui em um sistema de baixa pressão e baixa resistência sem válvulas e é regulado basicamente por dois fatores, pelo fluxo arterial esplâncnico e mesentérico determinado pela vasoconstrição das arteríolas nesses territórios e pela resistência vascular hepática determinada pela dificuldade encontrada pelo fluxo sanguíneo em atravessar os sinusóides hepáticos em direção às veias hepáticas(6, 7).

O tamanho ideal do fígado para um determinado receptor cirrótico varia entre 0,8 a 4% do seu peso corpóreo (*graft to body weight ratio – GBWR*)(8-10). Em adultos, o fenômeno clínico mais frequente em relação ao tamanho do enxerto inadequado é chamado de *small-for-size*, que ocorre quando se implanta um enxerto com peso menor que 0,8% do peso corporal total, e é reconhecido como entidade clínica que leva a

períodos mais prolongados de icterícia e dificuldade em se restabelecer a função hepática no pós operatório do transplante hepático. Em crianças, encontramos mais comumente um quadro denominado de *large-for-size*, que ocorre quando é implantado um enxerto com GBWR maior que 4%. A síndrome *large-for-size* não apresenta características clínicas e laboratoriais tão claras como sua correspondente no adulto. Acomete mais as crianças devido à disparidade entre os doadores disponíveis – geralmente adultos – e os receptores cada vez menores. É comum encontrarmos sinais de hipoperfusão hepática no curto prazo, maiores índices de rejeição celular aguda, síndrome compartimental abdominal, trombose de veia porta, complicações biliares e uma tendência maior de perda de enxerto a longo prazo(11).

A síndrome *small-for-size* ocorre mais comumente em pacientes adultos submetidos a transplante com doador vivo ou falecido com enxerto de fígado parcial. Este fenômeno tem sido amplamente estudado na literatura. Hessheimer *et al*, em um estudo experimental em porcos propuseram a manutenção do fluxo venoso portal $< 260 \text{ mL} / \text{min} / 100\text{g}$ de peso do fígado para se evitar a síndrome de *small-for-size*. Esta descompressão do sistema portal era realizada através de um *shunt* portocava com enxerto vascular sintético de politetrafluoretileno expandido (ePTFE)(12). Troisi *et al*, em um estudo em humanos adultos submetidos a transplante hepático com doador vivo, descreveram que um valor de $250 \text{ mL} / \text{min} / 100\text{g}$ de fígado é um fator determinante para o desenvolvimento da síndrome *small-for-size*(13). Enxertos parciais de fígado e o remanescente hepático dos doadores tem uma alta capacidade regenerativa, principalmente na primeira semana pós transplante. O aumento do fluxo portal interfere na produção da interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) bem como no efeito regenerativo promovido por esta molécula nos hepatócitos. Trabalhos em animais menores têm sugerido que a etiologia desta síndrome esteja relacionada a supressão da

regeneração hepática, ao contrário do que se pensava, que era de se tratar de uma ampliação da lesão de isquemia e reperfusão associada a um fígado pequeno e insuficiente em suprir as demandas metabólicas do paciente. O fluxo hepático também está implicado em aumento da lesão de isquemia e reperfusão pós transplante e em valores aumentados de transaminases no pós operatório do transplante hepático (14, 15). Pan *et al*, demonstraram em camundongos que o alto fluxo sanguíneo para o fígado parece fazer com que os mecanismos de regeneração hepática sejam suprimidos e que isto poderia ser a parte central do mecanismo de lesão hepática e disfunção do enxerto que ocorre nos casos de *small-for-size* (12, 16, 17). Feng *et al*, descreveram a hemodinâmica do fígado transplantado e sugere maneiras e algoritmos de como modular o fluxo venoso e arterial que chega ao fígado, *graft inflow modulation* (GIM), utilizando para isso técnicas que vão da ligadura da artéria esplênica, esplenectomia, anastomose da artéria hepática na veia porta, ligadura de colaterais *shunts* portocava e mesentérico-cava(18).

No que abrange o estudo dos transplantes realizados com enxertos com GBWR > 4% a literatura não apresenta tantos achados quando comparamos com os de transplante *small-for-size* provavelmente devido ao número proporcionalmente menor de crianças transplantadas em relação a adultos. Em 2013 de um total de 1723 transplantes hepáticos realizados no Brasil somente 204 foram em crianças(19). Algumas séries de casos e trabalhos experimentais descrevem o *large-for-size* associando o tamanho do enxerto como variável determinante para o desfecho deletério no resultado do transplante. Outros descrevem a síndrome tão somente como uma questão de continente *versus* conteúdo, de maneira que todos os efeitos mórbidos podem ser melhorados ou até extintos com a manutenção da cavidade abdominal sob um regime de baixa pressão e a maioria o faz mantendo o abdome do paciente aberto com telas ou outros materiais sintéticos por até uma semana, período o qual se torna possível o fechamento do mesmo(20, 21).

Experimentos em animais têm descrito os efeitos maléficos do aumento relativo do fluxo venoso portal no endotélio e nos mecanismos de regeneração hepática. Os trabalhos presentes na literatura não deixam claro se a síndrome *large-for-size* e o hipofluxo venoso portal são responsáveis por um aumento da lesão de isquemia e reperfusão devido a uma privação de oxigênio relativamente maior ou se os efeitos desta lesão inicial irão perdurar por um período prolongado com repercussões outras que não somente perda de hepatócitos.

Leal *et al*, descreveram junto ao Laboratório de Investigação Médica de Cirurgia Pediátrica e de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental (LIM-30 e LIM-26) um modelo de transplante hepático *large-for-size* em porcos. Foram demonstradas alterações bioquímicas e histológicas que ocorrem imediatamente após o implante do enxerto bem como as diferenças em relação ao transplante em animais de peso compatível. Na tentativa de reverter os efeitos nocivos do implante de um enxerto *large-for-size* foi proposto um terceiro grupo no qual os doadores eram submetidos a um pré-condicionamento isquêmico do enxerto (isquemia de 15 minutos com reperfusão de 15 minutos). Neste grupo foi possível observar após o procedimento uma menor expressão do gene pró-apoptótico, BAX, e do gene relacionado a fibrose hepática, *Transforming growth factor beta* (TGF- β) bem como um aumento na expressão do gene relacionado a regeneração hepática (IL-6) e atenuação dos efeitos deletérios do transplante *large-for-size*. (22, 23).

Derivações venosas são largamente utilizadas pelo cirurgião de transplante em uma variedade de situações. Antes da era dos transplantes os *shunts* portosistêmicos (portocava, esplenorrenal, mesentérico-cava) foram utilizados na descompressão do sistema porta com intuito de diminuir a pressão portal e as consequentes varizes de esôfago. Posteriormente, já na era dos transplantes hepáticos, os *shunts* foram utilizados

para substituir a veia porta nas situações onde havia trombose de veia porta e do sistema mesentérico-portal. Na atualidade os *shunts* têm sido cada vez mais utilizados em transplantes de pacientes adultos com o intuito de diminuir a pressão portal e o fluxo venoso portal até um ponto onde o enxerto hepático *small-for-size* possa se regenerar e se recuperar dos efeitos danosos do hiperfluxo venoso portal. Além disso uma grande quantidade de técnicas foram e ainda são usadas na reconstrução da veia porta no transplante hepático. De maneira análoga nas situações de *large-for-size*, o fluxo venoso portal pode ser modulado para se aumentar o aporte venoso para o fígado e tentar melhorar o estado de isquemia relativa ao qual o enxerto se encontra após o transplante hepático em um receptor com baixo fluxo venoso portal. O *shunt* mesentérico-cava com enxerto venoso homólogo tem sido utilizado e testado em humanos e animais com intuito de diminuir o fluxo venoso portal nos casos de *small-for-size*. O mesmo artifício pode ser utilizado para desviar o fluxo venoso da cava retro-hepática em direção a veia porta, aumentando-o(24).

Durante o transplante hepático o enxerto retirado do doador sofre agravo celular, molecular e bioquímico decorrente e proporcional ao tempo e ao tipo de isquemia. A isquemia fria consiste no período em que o enxerto permanece resfriado e preenchido com solução de preservação, e a isquemia quente período no qual o enxerto é colocado na cavidade do receptor para ser implantado até a liberação dos *clamps* e reperusão do mesmo.

Quando o fluxo sanguíneo hepático é restabelecido após o implante do enxerto no receptor, uma cadeia de eventos se segue mediados a princípio pela célula de Kupffer e posteriormente mantidos por um intrincado mecanismo que envolve lesão endotelial, apoptose celular e lesão ao parênquima hepático por espécies reativas de oxigênio e pela má perfusão da microvasculatura hepática. O óxido nítrico (NO), como molécula

vasodilatadora, e as endotelinas, como vasoconstritoras, possuem um papel fundamental na intensidade dessa lesão que é denominada de isquemia/reperfusão(25).

A lesão de isquemia/reperfusão (LIR) apesar de ser um fenômeno amplamente estudado na literatura científica apresenta diversos eventos que ainda não foram elucidados. Acredita-se que o mecanismo chave inicial da LIR hepática se baseie em uma resposta inflamatória intensa mediada pelas células de Kupffer (CK), estas, principais responsáveis pela liberação de espécies reativas de oxigênio no parênquima hepático durante o agravo. Nesta etapa do evento as células de Kupffer são responsáveis pela liberação destes oxidantes que por si só desempenham papel na indução da apoptose e na lesão das membranas celulares do endotélio sinusoidal e dos hepatócitos.

O TNF- α e outros mediadores ativam várias proteínas sinalizadoras envolvidas na apoptose, como as proteases, a caspase-3, a caspase-8 e a liberação do citocromo-C mitocondrial para o citoplasma. A cascata de eventos iniciada por essas substâncias leva a destruição do ADN e a morte celular. Apesar da inibição da produção dessas substâncias melhorarem a LIR alguns autores defendem a hipótese de que a morte celular na LIR do fígado se dá majoritariamente por necrose maciça das células hepáticas(26-28).

A apoptose é um fenômeno complexo que tem por objetivo final a ativação das caspases (*cysteine asparagil specific proteases*) que, por sua vez, destroem proteínas celulares vitais levando à morte celular. A apoptose se dá por duas vias distintas que convergem para a ativação das caspases, a via extrínseca e a intrínseca.

A via extrínseca é mediada por receptores de membrana que se ativam em resposta a estímulos extra-celulares. Os receptores mais comumente envolvidos nesse processo são os da superfamília de receptores do TNF (TNF-R). Os genes c-fos e c-jun pertencem a uma família a qual é ativada por uma grande quantidade de estímulos extra-celulares durante a lesão de isquemia e reperfusão hepática(29). Dentre estes fatores encontramos

citocinas e oxidantes, principalmente o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O produto da expressão desses genes é conhecido por formar um complexo proteico estável conhecido como fator de transcrição nuclear AP-1. Este complexo tem sido implicado na ativação de diversas citocinas pró-inflamatórias, reparo tecidual e apoptose. Alguns trabalhos associam a intensidade da expressão desses genes com a gravidade da LIR hepática(30-32).

A via intrínseca resulta do aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma. Esse processo é regulado pelas moléculas da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma*). Essa família é constituída por genes e por proteínas originadas a partir desses genes que têm função tanto anti-apoptótica quanto pró-apoptóticas. Entre os genes e as proteínas a que estes genes dão origem destacam-se a Bcl-2 e Bcl-XL com efeito anti-apoptótico, enquanto que o papel pró-apoptótico é desempenhado principalmente pelas Bak (*Bcl-2 associated killer*) e Bax (*Bcl-2 associated x protein*). Dessa forma, quando os níveis de Bcl-2 e Bcl-XL caem, a permeabilidade da membrana mitocondrial aumenta o que leva a liberação de proteínas ativadoras da cadeia proteolítica para o citoplasma; dentre elas, destaca-se o citocromo C, que atua ativando a cascata das caspases.

Na fase de execução da apoptose ocorre ativação das endonucleases, quebra da cromatina nuclear e do citoesqueleto. Há fragmentação da célula com a formação de corpos apoptóticos, constituídos de citoplasma, resto de organelas e fragmentos nucleares²⁷.

A célula de Kupffer (CK) é capaz de liberar citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6 que recrutam polimorfonucleares sistêmicos e linfócitos T-CD4+ perpetuando a lesão através da liberação de proteases no interstício e no parênquima hepático mesmo após o fluxo sanguíneo estar restabelecido. Ainda, a CK é largamente

ativada pela isquemia fria. Alguns estudos demonstraram que a supressão ou a amplificação de sua atividade pode melhorar ou piorar a LIR hepática. Os neutrófilos atraídos pelas citocinas liberadas pela CK, ampliam a LIR através da liberação de mais espécies reativas de oxigênio e diversas proteases. Os neutrófilos estão presentes nos estágios iniciais da lesão de isquemia e reperfusão e encontram-se amplamente distribuídos pelo parênquima hepático por onde adentram através da adesão de selectinas e integrinas expressas na sua membrana com moléculas de adesão intercelular (ICAM). O aumento da expressão da ICAM-1 na célula endotelial (CE) se dá pelo estímulo secundário à liberação de TNF- α e IL-1. De fato, a expressão da ICAM-1 pela CE tem sido relacionado com rejeição celular aguda enquanto que a sua neutralização diminui a LIR(33-35).

Na microvasculatura, este acúmulo de células inflamatórias aderidas à célula endotelial, associado ao edema do parênquima, levam a um afinamento do sinusóide hepático que contribui para a reperfusão não uniforme do tecido hepático e a presença de áreas de penumbra não vascularizadas ou pouco vascularizadas que irão contribuir como multiplicador da LIR.

No endotélio essas alterações são responsáveis, além de outras alterações, pelo fenômeno de *no-reflow*, que consiste na manutenção da situação de isquemia em algumas áreas do parênquima mesmo após o pleno restabelecimento do fluxo sanguíneo e, assim, intensificam o agravo aos hepatócitos. A fisiopatogenia do fenômeno de *no-reflow* é complexa e se baseia em uma perda do equilíbrio entre a produção do óxido nítrico pela célula endotelial, potente vasodilatador, e das endotelinas, marcadamente a endotelina-1 (ET-1), potentes vasoconstrictoras(33).

O óxido nítrico tem um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo da microvasculatura, bem como na ativação plaquetária, além de ser produzido pela enzima

óxido nítrico sintetase (NOS), que possui três isoformas: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS).

Durante a isquemia e reperfusão a enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) presente nos hepatócitos, células endoteliais e demais células do parênquima hepático é a responsável pela produção de grande quantidade de NO, que causa vasodilatação da microvasculatura e regula o fluxo sanguíneo microvascular hepático. Contrário a isso, modelos experimentais recentes têm mostrado melhora na lesão de isquemia/reperfusão quando se inibe a expressão do gene responsável pela síntese da iNOS(36).

Experimentos animais indicam que a eNOS protege o fígado na lesão de isquemia e reperfusão. Camundongos *knockout* (técnica na qual um dos genes do organismo é tornado inativo) para eNOS (-/-) mostram uma lesão exacerbada seguindo-se a isquemia hepática quente quando comparados com seus semelhantes selvagens, *wild type* (WT). De forma semelhante, animais eNOS (-/-) também mostraram maior dano hepático após isquemia fria e reperfusão quente em um modelo de transplante hepático murino(37).

Ao longo do tempo vários fatores têm sido estudados como prognósticos a longo prazo da viabilidade do enxerto e do resultado clínico após o transplante hepático. A capacidade do fígado em captar oxigênio e em manter suas funções metabólicas imediatamente após a reperfusão tem se mostrado viável como preditor deste resultado. Como condição indispensável para o bom funcionamento do enxerto também podemos incluir as condições hemodinâmicas do receptor e a capacidade deste organismo em manter a homeostase após o agravo cirúrgico e anestésico.

Modelos experimentais porcinos são utilizados pela semelhança anatômica, imunológica e fisiológica com seres humanos. Atualmente tornou-se procedimento factível para estudos de transplante hepático e treinamento das equipes envolvidas no processo de transplante hepático(38).

O presente estudo possui por finalidade aumentar o conhecimento a respeito dos fluxos vasculares hepáticos em um modelo de transplante hepático porcino *large-for-size*, sua relação com aumento da lesão de isquemia e reperfusão hepática, além de caracterizar os efeitos do *shunt* mesentérico-cava modificado no aumento do fluxo venoso portal e na respectiva lesão de isquemia/reperfusão.

2 – Objetivos

2.1 Geral

- Caracterizar as alterações hepáticas imediatamente após o transplante de um fígado grande para o tamanho do receptor *large-for-size* e avaliar a resposta hepática frente ao aumento do fluxo venoso portal.

2.2 Específico

- Caracterizar as relações fluxométricas encontradas em um modelo de transplante *large-for-size* porcino.
 - Relacionar o baixo fluxo portal com as alterações isquêmicas e lesivas ao enxerto hepático através de estudos imunoistoquímicos, bioquímicos, moleculares e fluxométricos.
 - Identificar o papel e os efeitos da modulação do fluxo venoso portal através do *shunt* mesentérico-cava.
-

3 – Materiais e Métodos

3.1 Amostra

3.1.1 Considerações Éticas

Todos os animais foram manipulados de acordo com as normas para a prática didático-científico da vivisseção brasileira, Lei nº 11.794, de 08 de Outubro de 2008, Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009 que regulamentam os procedimentos com animais submetidos à pesquisa científica e a resolução nº 714 de 20 de Junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) que regula os procedimentos de eutanásia. Este projeto foi aprovado em 30 de Maio de 2012 pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 123/12 (Anexo A).

3.1.2 Receptor

A amostra dos receptores foi composta de 16 animais recém desmamados do sexo masculino e feminino, saudáveis, com peso variando entre 17 kg e 38 kg, híbridos das raças Landrace e Large-White. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da FMUSP.

Os animais foram adquiridos através do Laboratório de Investigação Médica em Técnica Cirúrgica (LIM 26) da FMUSP receberam água e dieta *ad libitum* até 12 horas antes do procedimento onde foram distribuídos por sorteio em três grupos:

- A. Grupo controle (CTRL) – receptor de fígado pesando entre 0,8 e 4% do peso corpóreo do receptor (n=5)
- B. Grupo *large-for-size* (LFS) – receptor de fígado pesando acima de 4% do peso corpóreo do receptor (n=5)
- C. Grupo com shunt mesentérico-cava (SHUNT) – e com enxerto pesando acima de 4% do peso corpóreo do receptor (n=6)

3.1.3 Doador

Os doadores do grupo A (CTRL) foram 5 porcos com peso variando entre 18 e 30 kg, semelhante aos receptores. Como doador dos grupos B (*large-for-size* - LFS), e C (SHUNT) foram utilizados 11 porcos com peso variando entre 33 e 88 kg.

3.2 Métodos de Averiguação

3.2.1 Procedimento Anestésico

Os animais receberam injeção intramuscular de Xilazina (2 mg/kg) e Ketamina (10 mg/kg) como medicação pré-anestésica 30 minutos antes da indução anestésica. Após a sedação do animal, os mesmos foram pesados e então posicionados em mesa cirúrgica em decúbito dorsal, e um acesso periférico foi obtido com a punção de veia em orelha com cateter do tipo Jelco 20G. Procedeu-se então a indução anestésica com Propofol (3-5mg/kg) e intubação orotraqueal com cânula 7 a 9 Fr dependendo do peso do animal. Esse preparo inicial foi igual tanto para os animais doadores quanto para os receptores.

Os animais foram mantidos em ventilação mecânica com aparelho de anestesia InterMed® Interlinea A, sendo a anestesia mantida com Isoflurano 1,5 a 2,5% e Fentanil (0,1µg/kg/min) em bomba de infusão contínua. A monitorização consistiu em cardioscopia, oximetria de pulso, capnografia, temperatura, pressão arterial invasiva e pressão venosa central. A veia jugular foi dissecada e cateterizada com sonda 10 Fr para infusão de fluidos, aferição da pressão da veia hepática, da pressão venosa central e coleta de amostra para gasometria. No mesmo momento a artéria carótida foi cateterizada com sonda 8 Fr para medida da pressão arterial média e coleta da gasometria arterial.

3.2.2 Procedimento Cirúrgico do Doador

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião com magnificação por meio de lupa com aumento de 3,5 vezes e foco de luz acessória frontal. A abertura da cavidade abdominal se deu através de uma incisão mediana do xifoide à pube com afastador *Gosset* fixado na porção mais cranial da incisão.

Após liberação dos ligamentos hepáticos o hilo foi dissecado isolando a veia porta e tronco da artéria hepática seguindo-se rotina semelhante em todos os animais. Isto feito, passou-se para a fase de aferição dos dados que consistiu na coleta de duas amostras de biópsia hepática armazenada em RNALater® (ThermoFisher Scientific inc.) e formol 10%, posicionamento da ponta do cateter venoso da jugular na veia hepática, medida do fluxo da veia porta e artéria hepática, punção da veia porta com Jelco 22G para medida da pressão e coleta de amostras para gasometria (Figura 1).

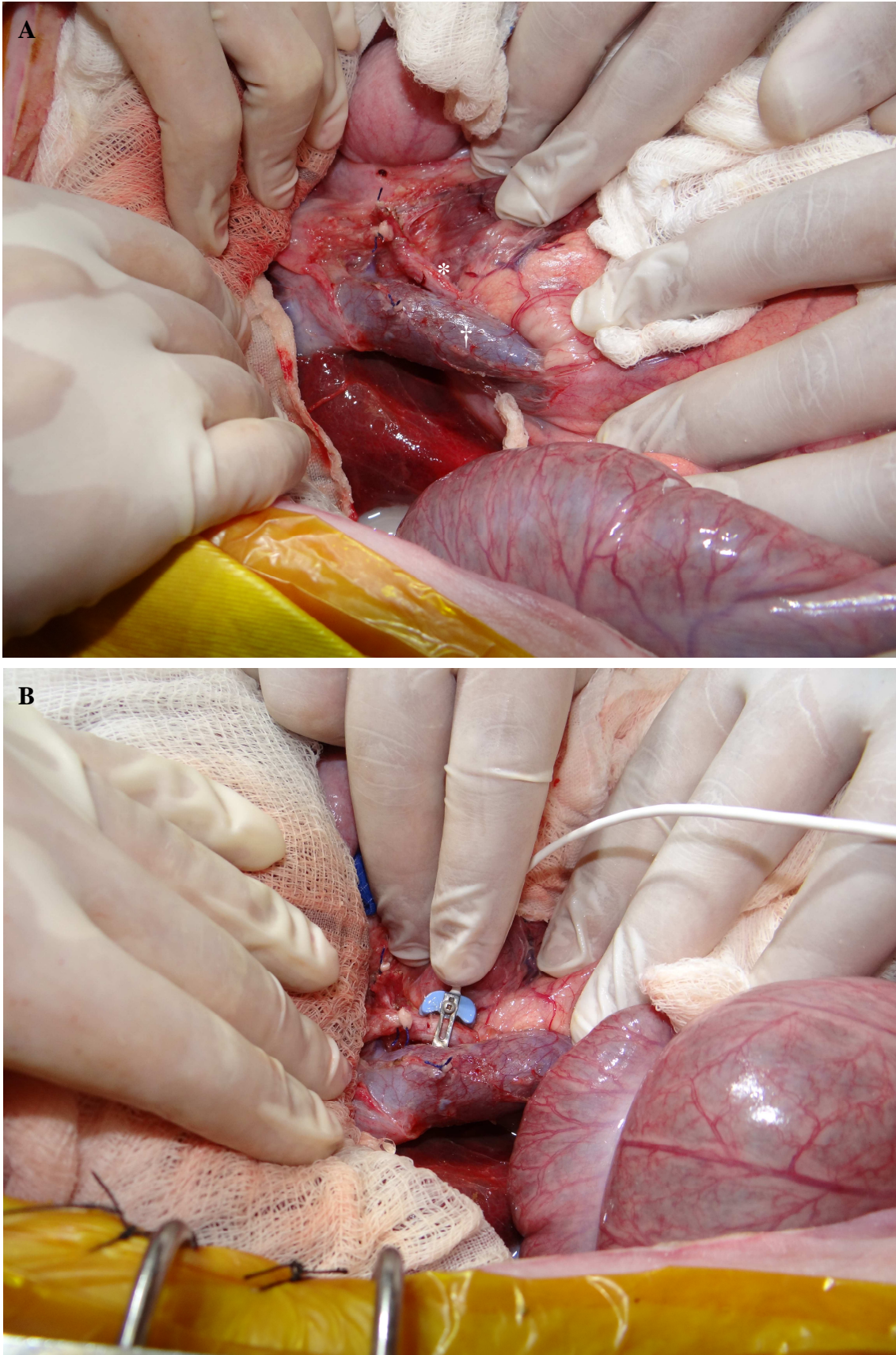


Figura 1 – Aspecto do hilo hepático após dissecação antes da aferição de fluxos (A), * artéria hepática, † veia porta; Colocação do sensor de fluxo na artéria hepática (B)

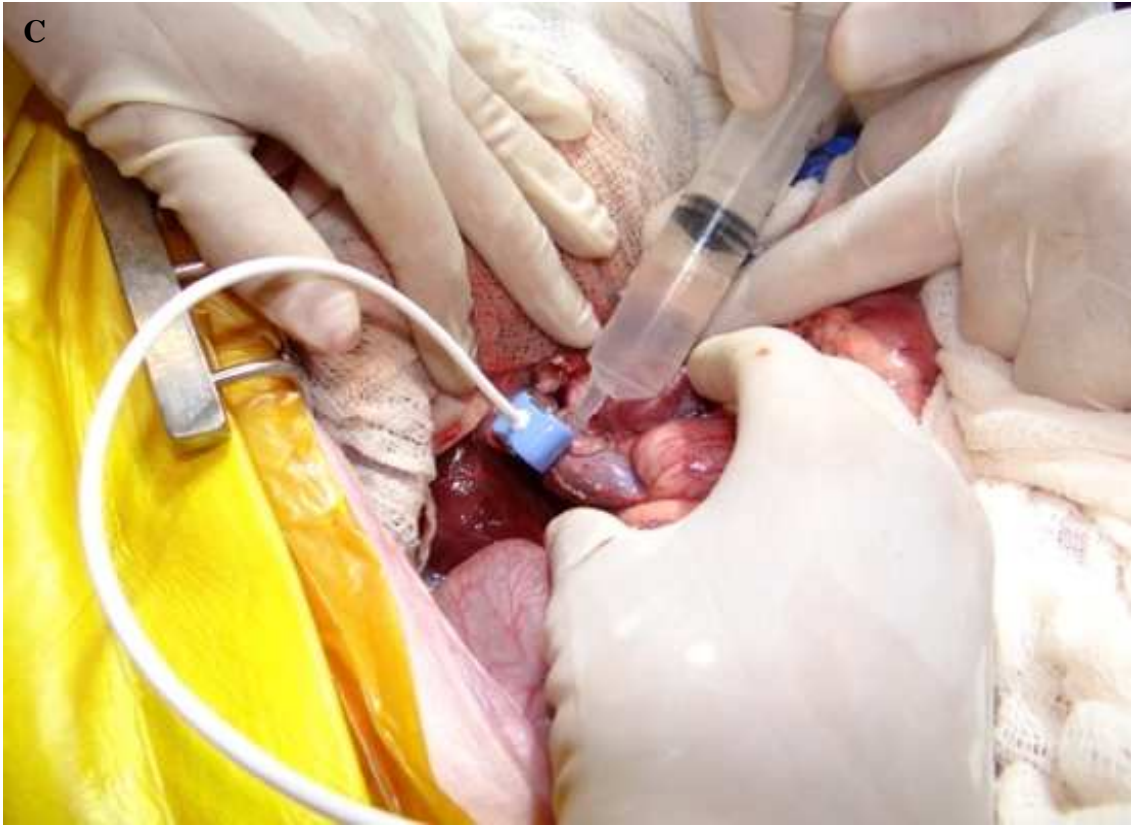


Figura 1 – (cont.) Colocação do sensor de fluxo na veia porta (C)

Após esse procedimento as pressões foram aferidas e gasometrias coletadas. Os dados da monitorização foram coletados a partir da memória do monitor multi-parâmetros (Dx2020, Dixtal Biomédica) e anotados na tabela de campo (Anexo B). Os fluxos sanguíneos foram aferidos em mL / min através do fluxômetro (T402, Transonic, EUA) e anotados em campo específico na mesma tabela. As amostras de sangue da gasometria foram encaminhadas e processadas imediatamente no gasômetro (ABL800 Flex, Radiometer). A partir de então iniciamos a fase de captação do enxerto hepático, em que a veia esplênica foi então individualizada e uma sonda 12Fr inserida na mesma com a ponta posicionada no tronco da veia porta (Figura 2A).

A artéria mesentérica superior foi dissecada logo acima da veia renal esquerda e reparada, para que durante a perfusão pela aorta fosse tracionada de modo que não houvesse perda de solução de preservação para o intestino.

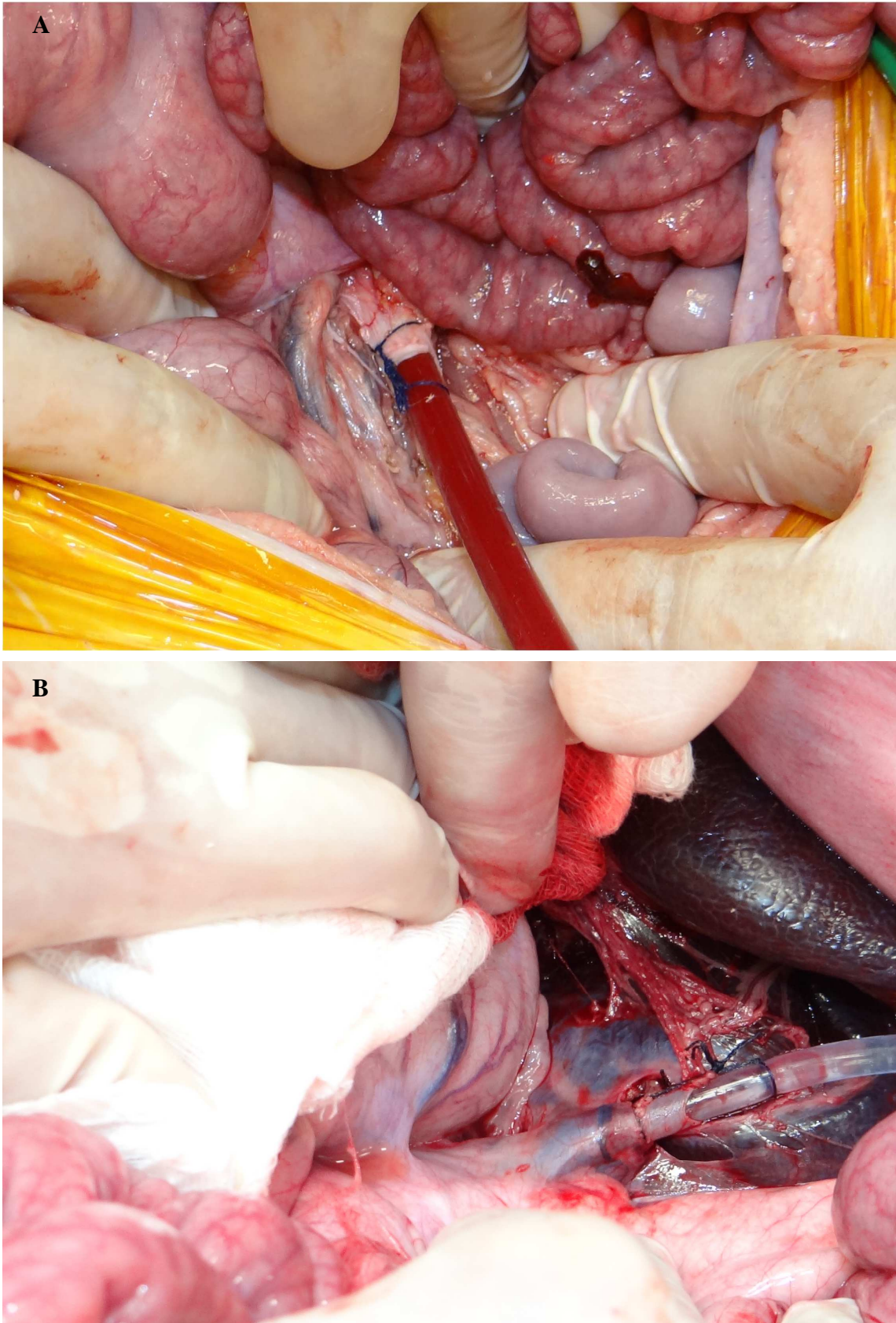


Figura 2 - Colocação do cateter na veia esplênica, para infusão da solução de preservação. (A); e na aorta infra-renal (B)

No momento da dissecação da aorta foi administrado 100 mg / kg de heparina sódica, e em seguida a mesma foi ligada em sua porção distal logo acima da bifurcação das artérias ilíacas. A seguir, uma sonda 14Fr foi introduzida na aorta e conectada a uma bolsa com anticoagulante (BAXTER ACD/CPD) para coleta de aproximadamente 300 mL de sangue total (Figura 2B). Quando esse volume foi alcançado, o diafragma foi aberto, a aorta torácica ocluída com *clamp* vascular e a veia cava superior seccionada junto ao átrio direito para permitir a drenagem de sangue e da solução de preservação. A artéria mesentérica superior foi então ligada com o objetivo de minimizar a perda de líquido de preservação, e iniciou-se a perfusão do enxerto hepático através da veia porta e artéria hepática.

A solução escolhida foi a de Euro Collins (Glicose 3,57% – Farmácia do Hospital das Clínicas – FMUSP) devido ao seu menor custo e maior facilidade de manipulação. Durante a perfusão a cavidade abdominal foi preenchida com soro fisiológico congelado e triturado. Foram administrados 4 litros de solução de preservação (2 litros na veia porta e 1 litro na aorta e 1 litro na bandeja) a 4°C. Após a eutanásia por exsanguinação o animal foi desconectado do aparelho de ventilação e iniciada a retirada do enxerto hepático. A veia porta seccionada em sua porção proximal, junto a veia esplênica, a veia cava inferior junto a veia renal direita, o colédoco junto ao pâncreas e o enxerto hepático retirado com a artéria hepática até o tronco celíaco. Nos experimentos realizados especificamente para o grupo SHUNT, após a retirada do enxerto hepático e antes da cirurgia da bandeja, retiramos um enxerto venoso que correspondia ao segmento de veia cava que se estendia da junção das veias renais proximalmente até a bifurcação das veias ilíacas distalmente.

3.2.3 Cirurgia da Bandeja

Durante o procedimento da bandeja e até a lavagem do enxerto, o mesmo foi mantido em um recipiente forrado com saco plástico preenchido com solução de preservação e resfriado por cubos de gelo. Nessa etapa, os elementos vasculares e a via biliar foram delicadamente dissecados e os ramos dos vasos do hilo hepático ligados. Veias frênicas também foram ligadas junto a veia cava superior. Para facilitar o implante, fios de prolene 4-0 da anastomose da veia cava inferior supra-hepática foram passados previamente nas extremidades laterais do vaso. O enxerto venoso foi então preparado ligando-se todas as tributárias da veia cava com intuito de criar um conduto cilíndrico estanque.

3.2.4 Cirurgia do Receptor

O animal receptor foi anestesiado e monitorizado da mesma forma que o doador. A incisão realizada foi uma incisão subcostal bilateral com extensão mediana cranial até o xifoide. Os ângulos da incisão foram presos à pata dianteira do animal de cada lado ajudando a apresentar a cavidade abdominal (Figura 3).

Em todos os grupos o enxerto foi lavado com 1L de soro fisiológico aquecido a 37°C imediatamente antes do implante no receptor. Ao contrário do doador, a dissecação dos elementos de fixação e vasculares do fígado do receptor foram realizados mais próximo do órgão quanto possível com intuito de manter pedículos mais extensos para as anastomoses. A via biliar da mesma forma foi seccionada e lavada no início da dissecação do ligamento hepatoduodenal.

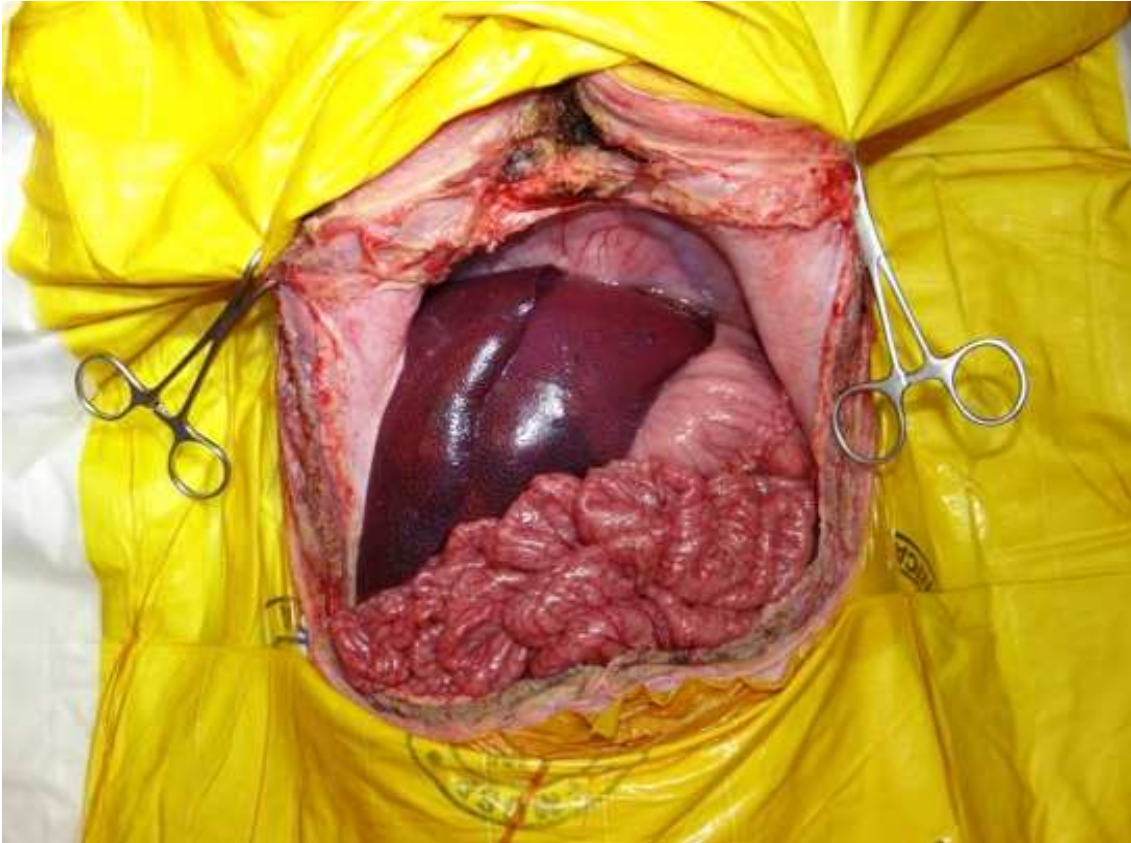


Figura 3 – Abertura da cavidade do receptor

Nos grupos CTRL e LFS, após o isolamento do fígado, foi realizado o *clampeamento* da veia cava inferior supra e infra-hepática e da veia porta, e o explante foi retirado e pesado. O enxerto foi implantado em posição ortotópica com as anastomoses vasculares realizadas da seguinte maneira:

1. Anastomose da veia cava inferior supra-hepática do receptor com a veia cava inferior supra-hepática do enxerto, com sutura contínua termino-terminal de prolene 4.0;
2. Anastomose da veia porta do receptor com a veia porta do doador, com sutura contínua termino-terminal de prolene 6.0 (Figura 4);
3. *Clampeamento* da veia cava inferior infra-hepática e liberação dos *clamps* da veia porta e veia cava supra-hepática com intuito de diminuir o tempo de isquemia fria, pouco tolerado pelos animais;

4. Anastomose da veia cava inferior infra-hepática do receptor com a veia cava inferior infra-hepática do enxerto, com sutura contínua termino-terminal de prolene 5.0;
5. Anastomose da artéria hepática comum a sua homônima no receptor termino-terminal com sutura contínua de prolene 7-0;
6. Anastomose termino-terminal do colédoco conforme descrito em relatos anteriores de modelos porcinos(22). (Figura 5)

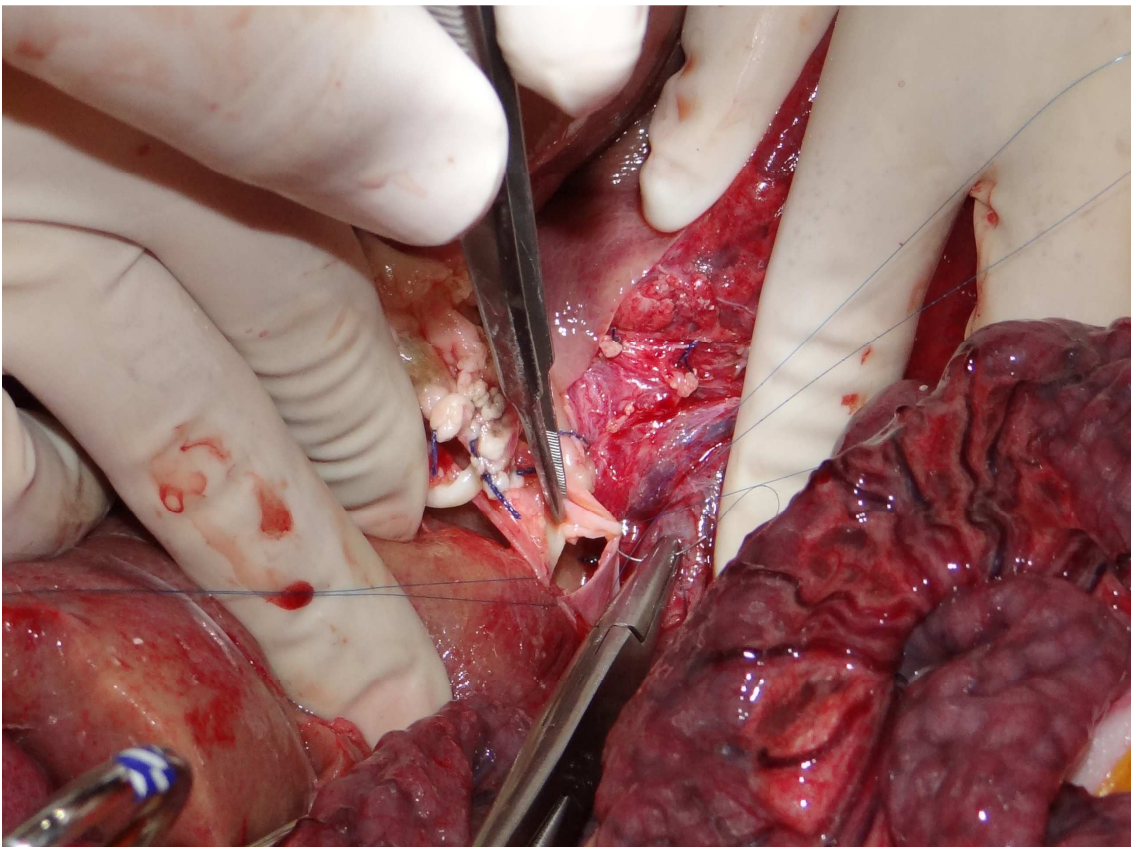


Figura 4 - Anastomose da veia porta do receptor com a veia porta do enxerto

Logo após a reperfusão foi administrado 5 mEq de bicarbonato de sódio/10 kg de peso do animal para corrigir a acidose metabólica do período anepático e 10mg/kg de cloreto de cálcio para estabilização da membrana da célula miocárdica contra os efeitos arritmogênicos do potássio.

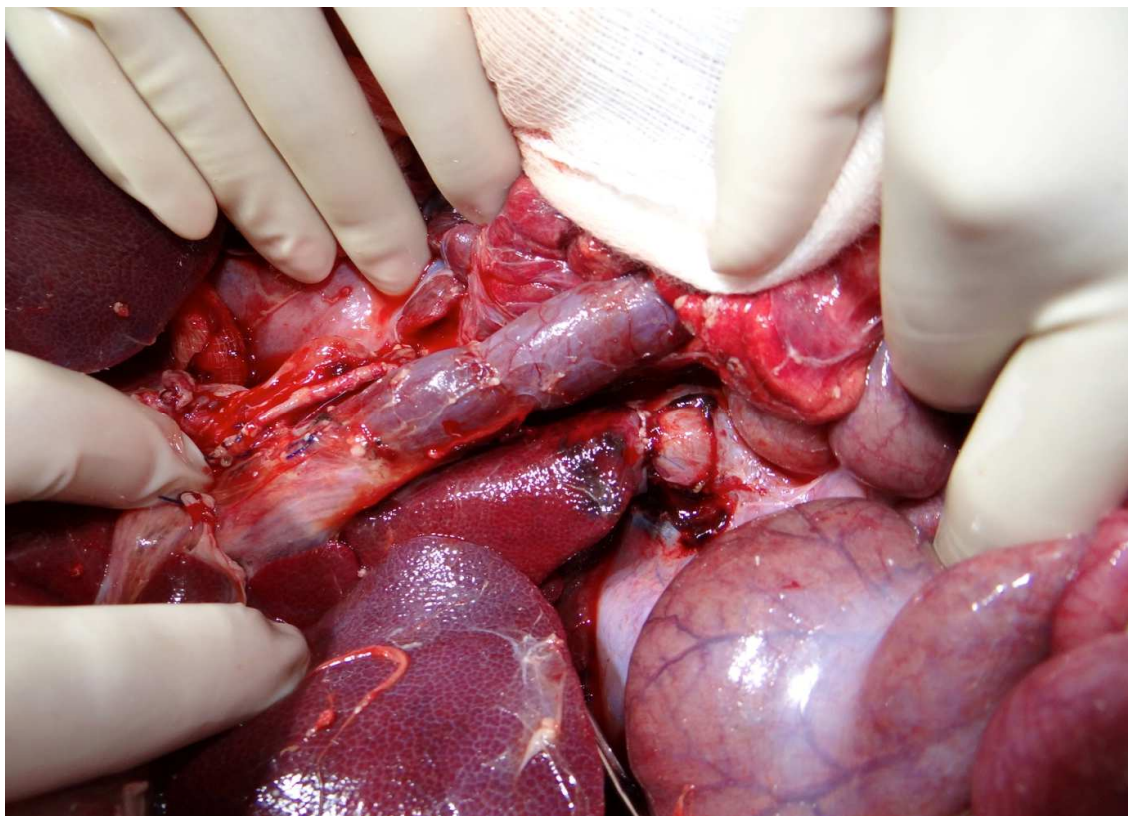


Figura 5 – Aspecto final das anastomoses portal, arterial e da veia cava inferior

No grupo SHUNT, diferentemente dos demais, antes de se iniciar o transplante hepático propriamente dito, iniciamos a dissecação da veia porta em sentido caudal até encontrarmos a junção da veia mesentérica superior com a veia esplênica e na superfície lateral desta última abrimos espaço na sua face anterior e posterior para a colocação de um *clamp* lateral, ocluindo-a parcialmente. Mais posteriormente, no limite posterior do análogo humano do forame de Winslow, a veia cava foi dissecada um pouco abaixo da junção da veia renal direita em sua superfície anterior e lateral direita e esquerda, com intenção de colocar um *clamp* ocluindo parcialmente a luz da veia cava. (Figura 6) Após a colocação dos *clamps*, um *shunt* em “H” com o enxerto de cava retirado do doador foi confeccionado entre a veia cava inferior e a veia mesentérica superior. O *shunt* foi realizado antes do transplante para se evitar manipulação do enxerto e das anastomoses após o implante. (Figura 6)

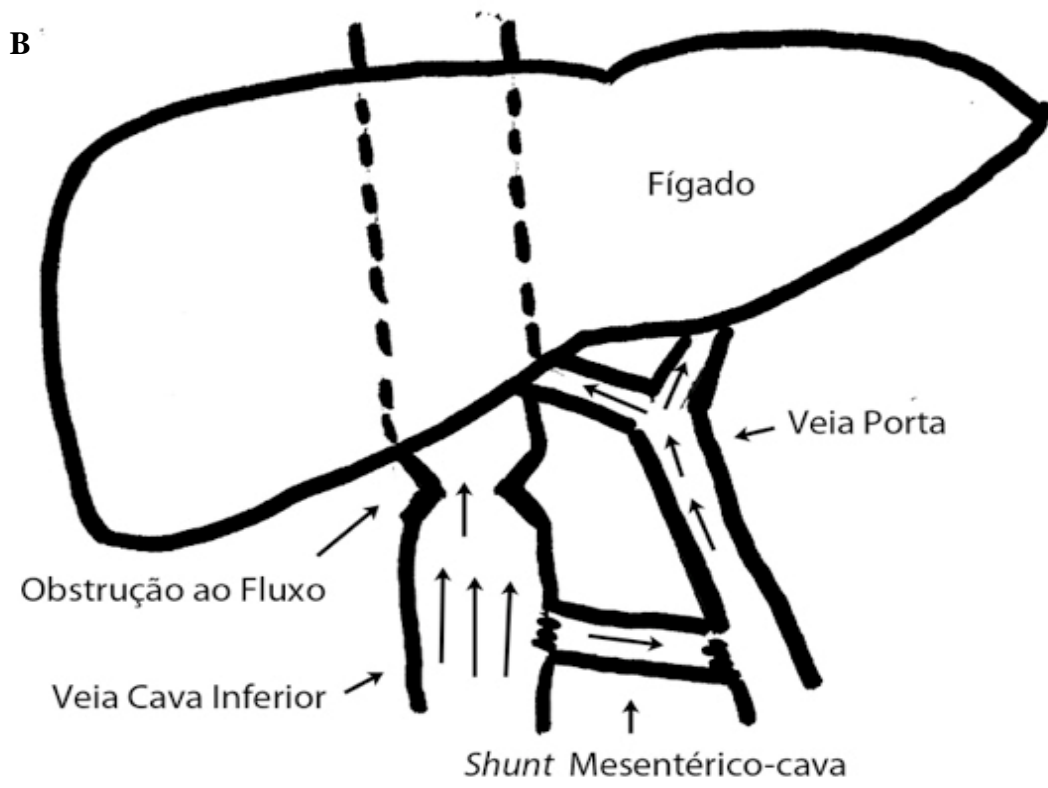
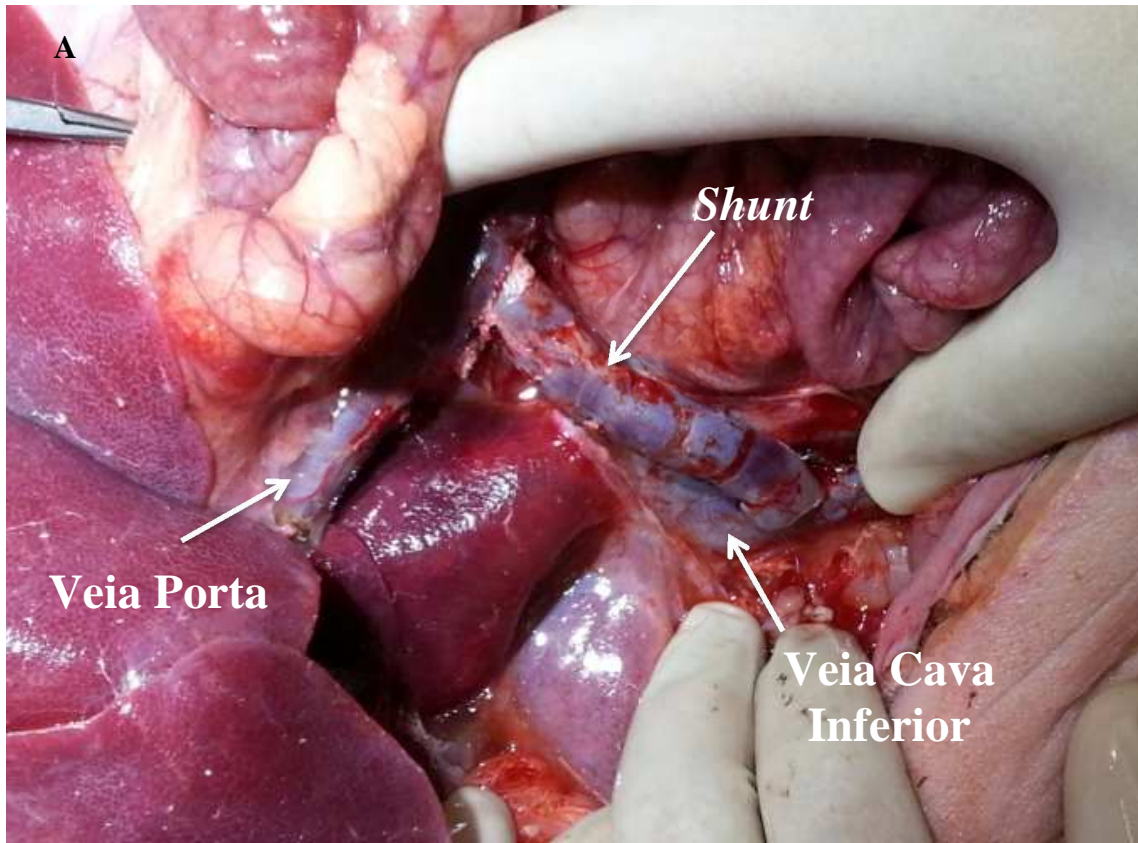


Figura 6 – *Shunt* mesentérico-cava antes do transplante hepático (A) e desenho esquemático (B)

Após a realização do *shunt* procedemos com a dissecção dos elementos do hilo hepático (artéria hepática, via biliar e veia porta), veia cava supra-hepática e veia cava infra-hepática. Mais uma vez após a colocação dos *clamps* necessários para a realização do transplante hepático o animal apresentava um grave choque cardiogênico devido a obstrução do retorno venoso da veia cava inferior que era contornado com infusão do colóide Voluven® 250-500 mL através do cateter da veia jugular e tempo de isquemia quente reduzido perfundindo-se o enxerto antes da anastomose da veia cava infra-hepática.

A sequência de anastomoses do receptor com o enxerto hepático no grupo SHUNT foi a seguinte:

1. Confecção do *shunt* mesentérico-cava que permanecia ocluído e heparinizado até o fim do implante;
2. Anastomose da cava supra-hepática do receptor com cava supra-hepática do enxerto;
3. Anastomose da veia porta do receptor com veia porta do enxerto;
4. Liberação dos *clamps* da veia porta e da veia supra-hepática;
5. Anastomose da cava infra-hepática do receptor com cava infra-hepática do enxerto hepático e obstrução ao fluxo acima do *shunt* mesentérico-cava;
6. Anastomose da artéria hepática.

Após a finalização do transplante a veia cava inferior acima do *shunt* mesentérico-cava foi totalmente ocluída forçando a passagem do retorno venoso da cava através do *shunt* e em direção ao enxerto hepático recém implantado.

Em seguida em todos os grupos aguardou-se o tempo de 1h para estabilização do animal e então foi iniciada nova fase de coleta e aferições de maneira análoga ao doador. As amostras de fígado acondicionadas em RNAlater® (ThermoFisher Scientific inc.) foram congeladas e posteriormente processadas pela técnica de RT-PCR para análise de expressão gênica e as acondicionadas em formol foram processadas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e analisadas em conjunto com a equipe de Patologia Hepática do HCFMUSP.

3.3 Métodos de Análise

A análise dos dados foi dividida em: Análise dos Procedimentos, Análise Hemodinâmica e Metabólica, Análise Histológica, Análise Imunoistoquímica, Análise Molecular e Estatística.

3.3.1 Análise dos Procedimentos e Animais

Foi utilizada uma tabela de campo (Anexo B) onde foram anotados os dados relacionados ao experimento: número do experimento, grupo do experimento, peso do doador, peso do receptor, peso do enxerto hepático, horário do início da perfusão do enxerto, horário do clampeamento do receptor e reperusão do enxerto além de dados gasométricos, fluxométricos e pressóricos utilizados nas outras análises. Estes dados foram utilizados para:

1. Comparar o peso dos receptores e dos doadores entre os grupos;
 2. Comparar o peso do enxerto hepático entre os grupos;
-

3. Calcular a relação do peso do enxerto pelo peso do receptor (GBWR – *Graft to Body Weight Ratio*) dividindo-se o peso em gramas do enxerto pelo peso do receptor;
4. Comparar o GBWR entre os grupos.

3.3.2 Análise Hemodinâmica e Metabólica Hepática

Antes da retirada do enxerto e uma hora após o fim das anastomoses no receptor durante a fase de aferição, foram coletadas amostras para medida das gasometrias arteriais, do sangue venoso portal e do sangue venoso da veia hepática além de medida do fluxo venoso portal, fluxo da artéria hepática, pressão da veia porta, arterial média e da veia hepática. Para quantificar a proporção de fluxo venoso portal ao qual o enxerto era submetido após o transplante em comparação com a medida aferida no doador foi criada uma nova variável a partir da razão entre o fluxo da veia porta do receptor, após o transplante, pela mesma medida no doador, assim denominada razão do fluxo venoso portal (rFVP).

Com esses dados foi possível calcular os seguintes parâmetros: conteúdo arterial (CaO_2), venoso hepático (CvO_2) e venoso portal de O_2 (CpO_2), oferta de O_2 (DO_2H), consumo de O_2 (VO_2H), taxa de extração de O_2 (TEO_2H), diferença de O_2 pré-hepático e pós-hepático (ΔO_2H). Os cálculos foram realizados através das seguintes fórmulas:

- ❖ $CaO_2 = Hb \times 1,34 \times SaO_2$;
 - ❖ $CvO_2 = Hb \times 1,34 \times SvO_2$;
 - ❖ $CpO_2 = Hb \times 1,34 \times SpO_2$;
 - ❖ $DO_2H = (CaO_2 \times FAH + CpO_2 \times FVP)$;
-

- ❖ $VO_{2H} = DO_{2H} - C_vO_2 \times (FVP + FAH)$;
- ❖ $TEO_{2H} = VO_{2H} \div DO_{2H}$
- ❖ $\Delta O_{2H} = (CaO_2 + CpO_2) - C_vO_2$;

3.3.3 Análise Histológica

O material proveniente das biópsias hepáticas foi fixado em formalina neutra tamponada a 10%, e em seguida imersa em parafina. Foram preparados cortes histológicos com espessura de 4 μ m, corados com hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico, levando-se em conta o grau do infiltrado inflamatório portal e parenquimatoso (inflamação), a presença de necrose, corpos apoptóticos e perda da estrutura arquitetural do parênquima hepático (necrose), intensidade de esteatose macro e microgoticular (esteatose) e o edema tecidual e sinusoidal (edema). Tais características foram avaliadas de modo semiquantitativo, por meio de pontuações de 0 a 3:

0. Ausência do achado;
1. Alteração leve;
2. Alteração moderada;
3. Alteração intensa;

Além disso, foi criada uma variável qualitativa ordinal a partir da soma dos valores de cada experimento em cada variável (inflamação, necrose, esteatose e edema) a qual foi denominada de índice de isquemia e reperfusão (IIR).

Na Figura 7 observamos respectivamente um campo com inflamação lobular grau 3 mostrando múltiplos neutrófilos distribuídos pelo parênquima e sinusóide hepático (marcados com a seta) e fotomicrografia de uma lâmina que apresentava necrose grau 3 com intenso desarranjo da arquitetura sinusoidal e hemorragia parenquimatosa.

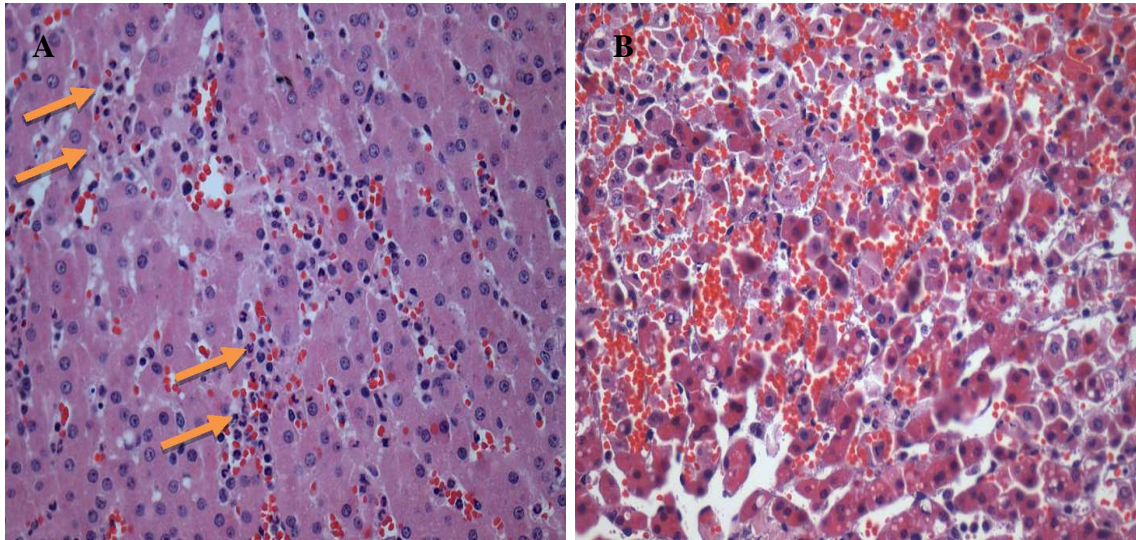


Figura 7 – Campo histológico corado por HE mostra inflamação lobular grau 3 (A) e necrose grau 3 (B)

3.3.4 Análise Imunoistoquímica

Para detecção da apoptose as quebras de cadeias de ADN “in situ” foram evidenciadas pelo método do TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated digoxigenin uracil triphosphate nick end labeling*), utilizando kit específico – *In Situ Cell Death Detection Kit, POD* - Roche, Cat. No 11 684 817 910. Esse método detecta a fragmentação internucleossômica do ADN, resultante da ativação das cascatas apoptóticas permitindo a identificação dos núcleos das células que passam a sofrer tais alterações.

No presente estudo fragmentos de tecido hepático foram fixados em formalina neutra a 10%, incluídos em blocos de parafina, seccionados com a espessura de 5 μm e

fixados em lâminas especiais salinizadas. A seguir os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente de etanol e submetidos à digestão enzimática com 20 µg/mL de proteinase K (Sigma®) por 15 minutos a 37 °C e lavagens com PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂).

Os cortes foram imersos em solução de citrato de sódio 0,1% e Triton X-100 0,1% por 2 minutos a 4°C para permeabilização celular e então incubados com solução de enzima TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) e mistura de nucleotídeos em tampão de reação a 37°C por 30 minutos. Posteriormente os cortes foram lavados com PBS, incubados com Converter-POD em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. A revelação da cor foi feita com substrato cromogênico (3, 3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride – DAB - Sigma®, D-5637 - por 1 minuto para detecção das células em apoptose. Seguiu-se contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 5 minutos e montagem dos cortes em meio permanente Entellan (Merck, 1.07961) e lamínula.

A análise histomorfométrica das lâminas preparadas por este método foi realizada através de uma amostragem aleatória de 5 campos por lâmina, utilizando-se microscópio óptico Nikon® Eclipse 50i (Nikon Co., Tóquio, Japão) com objetiva com graticulo onde foi realizada a contagem total de núcleos de hepatócitos e a contagem de núcleos corados pelo método obtendo-se um percentual por campo aferido de núcleos corados (TUNEL-positivos) conforme exemplificado na Figura 8.

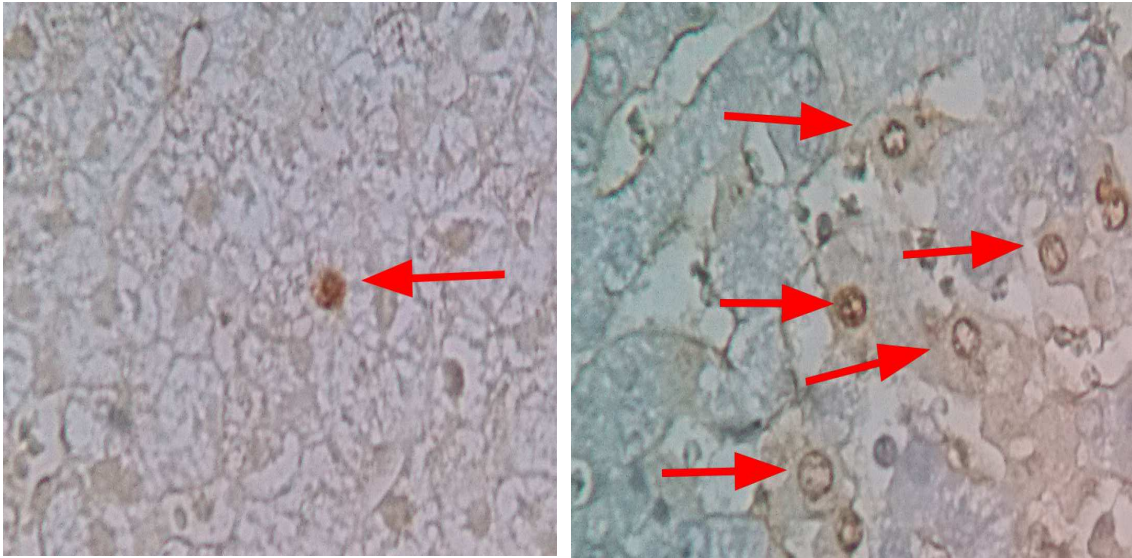


Figura 8 – Aspecto de lâmina da imunistoquímica (TUNEL) no grupo CTRL (esquerda) e no grupo LFS (direita)

3.3.5 Análise Molecular

3.3.5.1 Extração de ARN

Foi realizada extração do ácido ribonucléico (ARN) de todos os fragmentos de fígado coletados. Aproximadamente 100 mg de tecido hepático foi fragmentado em pulverizador de tecido (Mikro-Dismembrator U Sartorius, Germany) após adição de nitrogênio líquido. O pulverizado foi homogeneizado em 700 μ L da solução Trizol® (Invitrogen Life Technologies, USA).

A solução assim obtida foi incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente para completa dissociação de nucleoproteínas, e em seguida foram adicionados 200 μ L de clorofórmio. Esta solução foi centrifugada na velocidade de 10.000 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos em temperatura ambiente. Ao término da centrifugação foi obtida a separação da mistura em 3 fases: uma inferior de coloração avermelhada

(fenol-clorofórmio), uma interfase (proteínas), e uma superior, incolor e aquosa. Esta última que contém o ARN foi transferida para um tubo limpo onde foi adicionado álcool isopropílico. A solução permaneceu em repouso durante 15 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, foi submetida à centrifugação na velocidade de 10.000 rpm por 15 minutos. O ARN precipitado no fundo do tubo ao término da centrifugação foi ressuspenso em água bidestilada tratada com 0,01% de Dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenado a -80°C para posterior avaliação.

A concentração de ARN foi determinada com a utilização de espectrofotômetro para análises qualitativas e quantitativas de ADN/ARN modelo Biofotômetro (Eppendorf AG, Alemanha), nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

Após a determinação da concentração, um micrograma do ARN foi submetido à eletroforese em gel de agarose para avaliação da sua integridade através da visualização dos fragmentos correspondentes ao ARN ribossômico 18S e 28S.

3.3.5.2 Transcrição Reversa

Um micrograma de ARN total de cada amostra foi utilizado para síntese de ácido desoxirribonucléico complementar (cADN) pela ação da enzima Superscript III RnaseH transcriptase reversa (Invitrogen Life Technologies, USA). A reação compreendeu os seguintes reagentes: 1 µL de ARN total, 100 pmoles de Oligo (dT) 12-18 primers, 5X tampão da enzima, 0,1M de dithiotreitol, 500 µM de cada um dos deoxinucleotídeos, 200 unidades de SuperScript III, para volume total de 20 µL que era processada a 37° C durante 1 hora.

3.3.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa Quantitativa (qRT-PCR)

Foram avaliadas a expressão dos genes relacionados a apoptose, Bax (pró-apoptótico) e Bcl-XL (anti-apoptótico), dos genes que avaliam o efeito do óxido nítrico, eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) e iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), dos genes de ativação imediata, c-fos e c-jun, de genes relacionados a lesão inflamatória da isquemia/reperfusão IL-6 e TNF- α e do gene ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule*), no tecido hepático dos animais pertencentes aos três grupos de estudo: controle (CTRL), large for-size (LFS) e grupo *shunt* (SHUNT). Este estudo foi realizado através da técnica de RT-PCR quantitativo ou RT-PCR em tempo real. O gene β -actina foi amplificado como controle interno para a transcrição do ARN e também como fator de correção da quantidade de cADN sintetizado.

Os *primers* utilizados para amplificação dos genes descritos estão dispostos na Tabela 1. Foram padronizadas as condições de temperatura, concentração de *primers* e a eficiência das reações de amplificação de todos os genes estudados e do gene β -actina. Foi elaborada uma curva com diluições seriadas da concentração de cADN para cada um desses genes para assumir a eficiência das reações, o que tornou possível a avaliação da expressão dos mesmos. (Anexo D)

A técnica de RT-PCR quantitativo é baseada no monitoramento da fluorescência da amplificação de ADN ciclo a ciclo, o qual foi realizado no equipamento Rotor Gene Q, 5plex, HRM (Qiagen, Germany). O número de cópias dos genes estudados foi determinado utilizando-se SYBR Green I, um corante fluorescente intercalante de ADN que é captado pelo termociclador a cada novo ciclo da reação de PCR e permite que o aparelho desenhe uma curva de amplificação para cada amostra.

Tabela 1 – *Primers* utilizados para realização do RT-PCR

Gene	<i>Primers</i>	Nº no banco de genes	Pares de Bases
β actina	Sense: 5'-tcc aga ggc gct ctt cca-3' Antisense: 5'-cgc act tca tga tcg agt tga-3'	U07786	86
Bax	Sense : 5'-ctg gga ctt ctt gct gga ttt gc -3' Antisense: 5'-cag ggt gaa gca ggt gaa gat -3'	AY550048	138
Bcl-xL	Sense : 5'-gga gct ggt ggt tga ctt tc-3' Antisense: 5'-gtt tcc tct tct gat tca gtc-3'	AF216205	123
eNOS	Sense: 5' -aca tct gca acc aca tca agt acg-3' Antisense: 5' -cac cag ttg gct gtt cca gat c-3'	U59924	119
IL-6	Sense: 5' -cga gcc cac cag gaa cga aag -3' Antisense: 5'-aag cag ccc cag gga gaa ggc -3'	M86722	106
iNOS	Sense: 5' - tct tgc cta gga gcc atc at -3' Antisense: 5' - tcc ttt gtt acc gct tcc ac- 3'	NM 001143690	176
TNF- α	Sense: 5'-cca cca acg ttt tcc tca ct -3' Antisense: 5'-ggc act gag tcg atc atc ct -3'	NM 214022	191
c-fos	Sense: 5' - acg gtg act gct atc tcg ac -3' Antisense: 5'-tct tct tct ggg gac aac tg -3'	JX 861095	224
c-jun	Sense: 5' - acc ttg aaa gcg cag aac tc-3' Antisense: 5'-aac agt ctc gcc tca aaa cg -3'	NM 213880	153
ICAM	Sense: 5' - ttc ctt gga tgg act gtt cc -3' Antisense: 5' - cgt ctg cca gca tta tct ca -3'	NM 213819	179

O volume total da reação de 15 μ L foi composto de 1 μ L de cADN, 7,5 μ L de Platinum SYBER Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen Life Technologies), 0,3 μ L α (solução de 10 μ M) de cada iniciador para cada um dos genes estudados e água.

Todas as reações foram realizadas em termociclador acompanhadas de um controle de contaminação da reação ausente de material genético. Cada amostra foi quantificada em triplicata tanto para o gene alvo como para o gene interno.

O protocolo de amplificação constituiu-se das seguintes etapas: as amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos. A seguir foram realizados 40 ciclos com desnaturação

a 95 °C por 20 segundos, anelamento a 60 °C (Bax, Bcl-XL, IL-6, β -actina, iNOS, c-fos, c-jun, TNF- α , ICAM) e 62 °C (eNOS) por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. O ciclo final foi seguido por 5 minutos de extensão a 72 °C.

A amplificação gênica realizada pela qRT-PCR foi analisada utilizando-se a quantificação relativa. Esta descreve a expressão gênica de uma amostra em relação à outra, assim, os resultados deste tipo de quantificação representam ordens de grandeza, como por exemplo, valores menores que um são menos expressos e valores maiores que um são mais expressos em relação ao calibrador.

Neste trabalho, os níveis de expressão dos genes foram avaliados de forma relativa em relação a um calibrador (*pool* de cADN de animais doadores) após a sua normalização com o controle endógeno, o gene β -actina. O calibrador é a amostra escolhida como referência, que terá o valor de RQ (*Relative Quantification*) = 1 UA (Unidades Arbitrárias).

Na quantificação relativa é avaliada a relação do Ct (*threshold cycle*) obtido das amostras. O Ct é o primeiro ciclo de amplificação, no qual o *amplicon* de ADN é detectado acima da linha basal. Dessa forma, os possíveis fatores interferentes, associados aos estágios tardios da reação são minimizados.

O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método descrito por Livak. Esse método é determinado pela equação $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (39)

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ onde } \Delta Ct = Ct \text{ alvo} - Ct \text{ endógeno, e } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ calibrador}$$

Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de dissociação “melting”, com a finalidade de verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de

formação de dímeros de oligonucleotídeos iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico, que poderiam fornecer resultados falsos.

Foram realizadas também curvas de eficiência, para avaliar o desempenho da reação de qRT-PCR em termos de sensibilidade bem como uma curva de amplificação de RT-PCR Real Time. (Anexo B)

3.3.6 Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando o pacote StataCorp. 2013. *Stata Statistical Software: Release 13*. College Station, TX: StataCorp LP. Em todas as variáveis foram realizados cálculos de estatística descritiva com achados de média, mediana, desvio padrão e variância. Quando comparamos médias de duas variáveis sabidamente de distribuição normal utilizamos o teste t de Student (para amostras com variâncias iguais) e o teste t com correção de Welch para amostras com diferentes variâncias. Para as comparações entre as variáveis não paramétricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney (Wilcoxon *rank-sum test*), adotando-se um $p < 0,05$ como significativo.

Para comparação de três ou mais variáveis foram utilizados ANOVA (*Analysis of variance*) *one-way* com teste *post-hoc* de Bonferroni para dados de distribuição normal e o teste de Kruskal-Wallis para as comparações não paramétricas. Os gráficos de caixa foram desenhados utilizando-se os valores máximo e mínimo, intervalo interquartil e mediana.

Os dados foram apresentados da seguinte forma: mediana (valor máximo – valor mínimo) ou média \pm desvio padrão.

Análise de regressão linear foi elaborado a partir da correlação entre as variáveis. Os dados foram apresentados em gráficos de dispersão com coeficiente de determinação (R^2), um $p < 0,05$ foi considerado significativo para a inclinação da reta.

4 – Resultados

4.1 Análise dos Procedimentos

Para caracterizar o estudo conforme o modelo apresentado mostramos na Tabela 2 os dados referentes as características ponderais dos animais de cada grupo do estudo.

Tabela 2 – Características ponderais dos animais

	CTRL (n=5)	LFS (n=5)	SHUNT (n=6)	<i>p</i>
Peso Receptor (kg)	20 (17,5-30,5)	22 (17,3-38)	20,25 (17,9-29)	0,5
Peso Doador (kg)	18,2 (17,5-30,5)	41,5 (33-88)	42,5 (39-60,6)	0,01*
Peso Enxerto (g)	680 (610-990)	1195 (875-1960)	1185 (945-1605)	0,01*
GBWR (%)	3,45 (2,84-3,59)	5,06 (4,05-7,18)	6,03 (4,1-6,32)	0,009*

Mediana (valor máximo – valor mínimo), * teste de Kruskal-Wallis

No Gráfico 1 observamos os pesos dos animais doadores e receptores nos três grupos do estudo evidenciando a similaridade no grupo CTRL e a diferença nos grupos LFS e SHUNT.

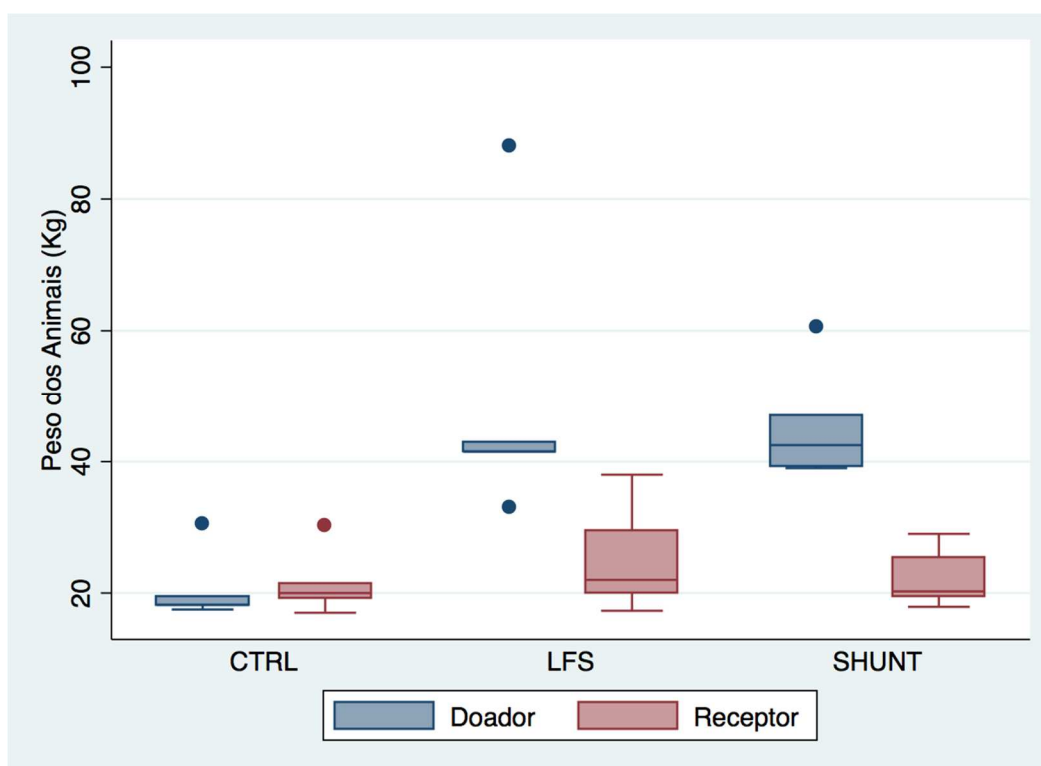


Gráfico 1 – Pesos dos doadores e receptores separados por grupos

A razão do enxerto pelo peso corporal do animal (GBWR) foi significativamente maior no grupo LFS e SHUNT em relação ao grupo CTRL (Gráfico 2). O peso dos receptores foi controlado e variou pouco entre os grupos não tendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos no teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,65$).

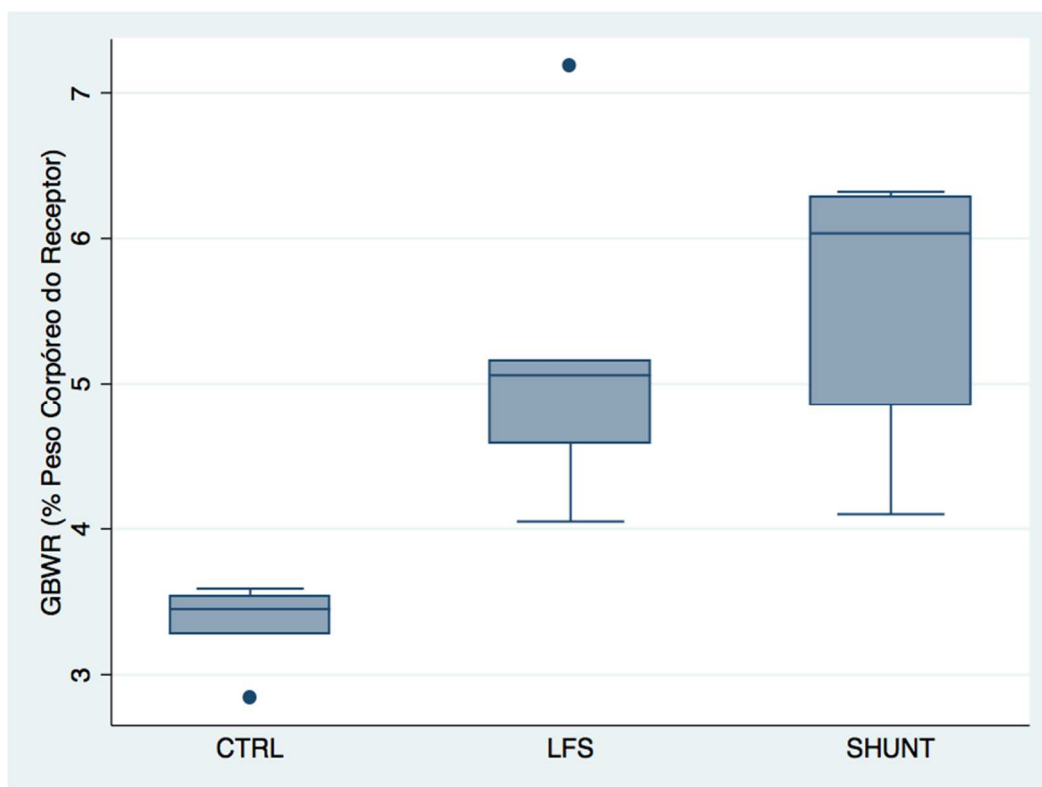


Gráfico 2 – Razão do enxerto pelo peso corporal do animal (GBWR) entre os grupos.

Esta diferença de peso dos animais refletiu o tamanho do enxerto implantado em cada grupo estudado, como observamos no Gráfico 3. Os pesos dos enxertos dos grupos LFS e SHUNT foram significativamente maiores que os do grupo CTRL ($p = 0,01$), o que influenciou os resultados do GBWR nos grupos.

Conforme esperado, foi verificado que o peso do enxerto representou GBWR proporcionalmente maiores quando utilizado como variável independente para explicá-lo.

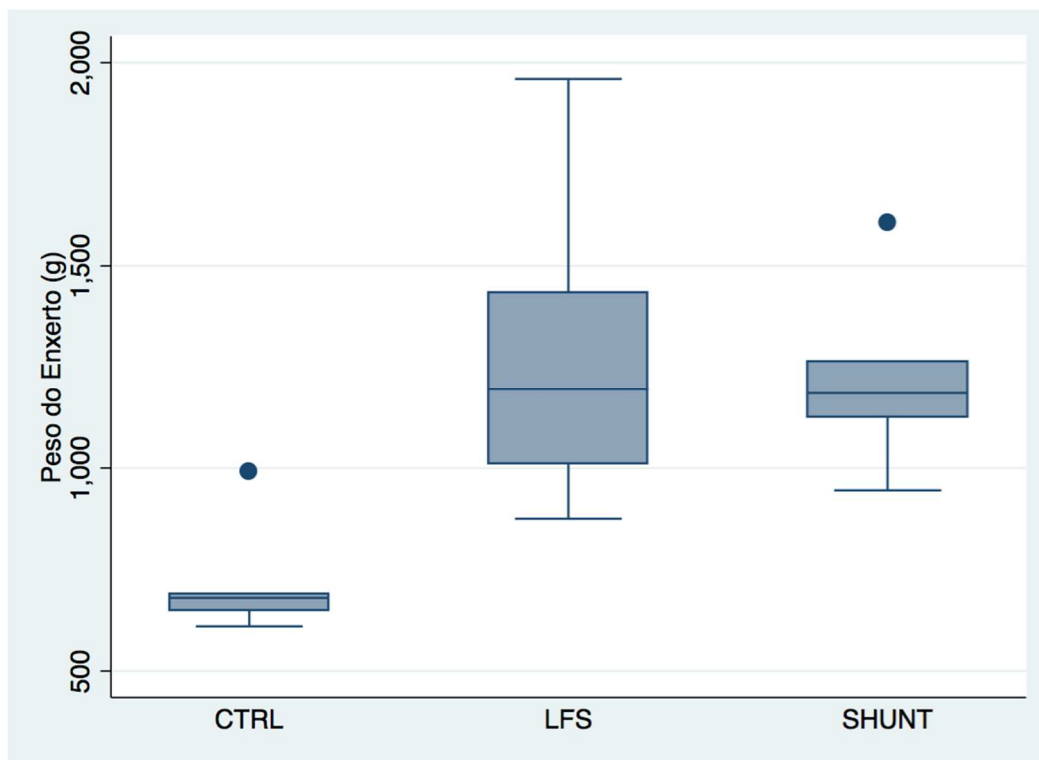


Gráfico 3 – Pesos do enxerto por grupos

Na Tabela 3 são mostradas as características metabólicas e bioquímicas dos procedimentos em cada grupo. Apesar do grupo CTRL apresentar medianas de desempenho melhores em relação aos demais grupos, a análise estatística não foi capaz de identificar diferenças estatisticamente significativas na maioria das variáveis quando comparamos dados dos três grupos em conjunto.

Parte das medianas dos procedimentos do grupo SHUNT ficaram em uma posição intermediária entre o grupo CTRL e o grupo LFS no entanto sem diferença estatisticamente significativa (Tabela 3).

Os valores da alanina aminotransferase (ALT) variaram pouco entre os grupos e não apresentaram diferença entre os mesmos. Entretanto, quando comparamos os grupos experimentais separadamente observamos que a aspartato aminotransferase (AST) apresentou diferença estatística entre os grupos CTRL (629 U/L, min 121- max 760) e LFS (1006 U/L, min 710 - max 1496) ($p = 0,01$) mas não entre os grupos CTRL (629

U/L, min 121 - max 760) e SHUNT (761 U/L, min 443 - max 2051) ($p = 0,13$) (Gráfico 4). Ao compararmos os três grupos em conjunto não foi estatisticamente significativo (Tabela 3).

Tabela 3 – Características metabólicas e bioquímicas dos procedimentos

		CTRL (n=5)	LFS (n=5)	SHUNT (n=6)	p^*	
Receptor	DO2H	13,2 (8,1-20,3)	6,3 (4,3-9,5)	6,55 (4,3-16)	0,09	
	VO2H	6,9 (2-9,2)	3,3 (2,9-4,6)	4,25 (2,2-5,8)	0,12	
	O2ERH	0,48 (0,22-0,56)	0,53 (0,38-0,72)	0,54(0,35-0,72)	0,5	
	CpO2	10,2 (8,3-12,1)	11,88 (9,06-13,46)	9,43 (5,51-8,39)	0,35	
	CaO2	17,2 (13-18)	19,03 (17,1-19,8)	17,52 (13,4-19,7)	0,14	
	CvO2	6 (4,9-7,3)	6,37 (2,9-9,88)	5,21 (1,91-8,34)	0,76	
	AST	629 (121-760)	1006 (710-1496)	761 (443-2051)	0,06	
	ALT	54 (40-105)	77 (55-120)	108 (34-150)	0,32	
	Hb	12,9 (9,7-13,4)	14,3 (12,8-14,9)	13,15 (10-14,9)	0,16	
	pH (art)	7,26 (7,22-7,39)	7,18 (7,07-7,13)	7,22 (7,13-7,38)	0,04	
	MAP	64 (58-81)	57 (52-76)	53 (40-65)	0,11	
	Doador	DO2H	12 (9,4-11,5)	11,4 (10,5-17)	12,15 (11,1-21,9)	0,60
		VO2H	3 (1,7-4,5)	3,3 (2,8-4,8)	3,2 (0,4-6,7)	0,40
		O2ERH	0,24 (0,1-0,39)	0,25 (0,19-0,45)	0,25 (0,04-0,33)	0,52
AST		51 (46-78)	55 (50-97)	46 (24-90)	0,34	
ALT		58 (23-62)	43 (25-51)	40,5 (31-62)	0,11	
Hb		9,3 (9,8-10,2)	11,6 (9,6-12,4)†	10,7 (9,5-12)	0,03	
pH		7,46 (7,42-7,55)	7,36 (7,31-7,56)	7,47 (7,34-7,55)	0,17	

Mediana (valor máximo – valor mínimo), * teste de Kruskal-Wallis

O pH arterial dos receptores do grupo LFS apresentou diferença em relação aos do grupo CTRL e, apesar do grupo SHUNT não apresentar diferença significativa entre as medianas de pH, este apresentou uma posição intermediária entre o grupo CTRL e LFS com diferença entre os grupos CTRL e LFS ($p = 0,02$) mas não entre o grupo CTRL e SHUNT ($p = 0,47$) (Gráfico 5). Podemos observar ainda que o pH variou pouco e de

forma não significativa entre os doadores. No entanto, houve um decréscimo significativo quando comparamos as medianas destes com a dos receptores ($p < 0,0001$).

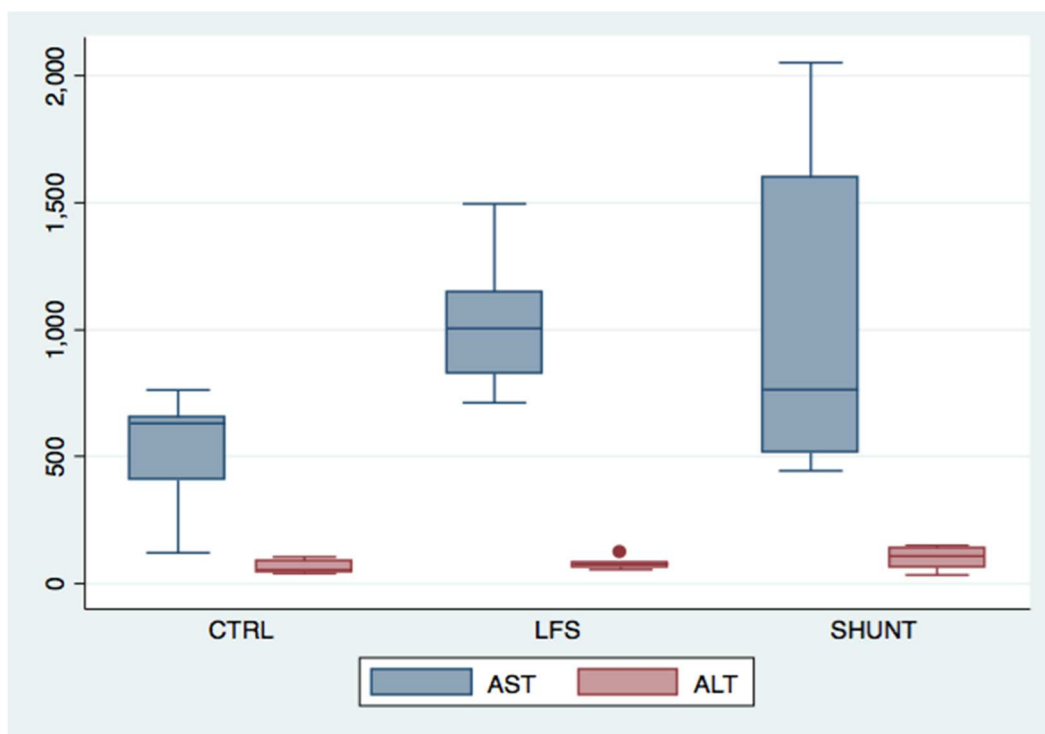


Gráfico 4 – AST e ALT dos animais receptores por grupo

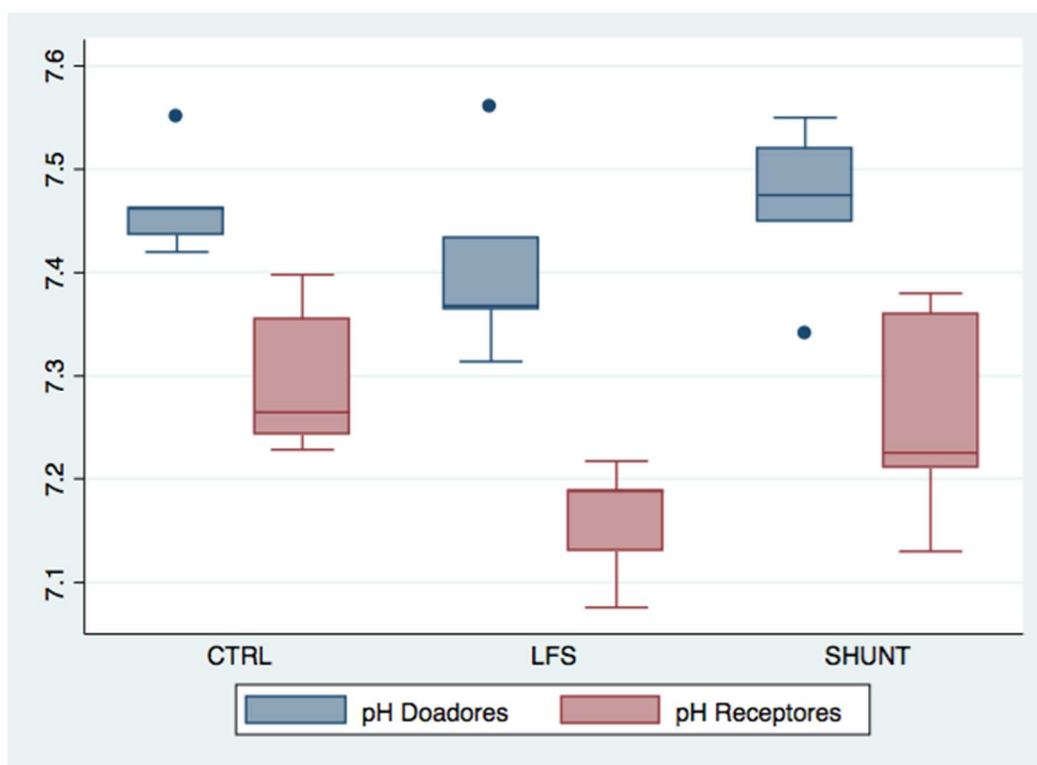


Gráfico 5 – pH arterial dos animais doadores e receptores

4.2 Resultados do Fluxo Venoso Portal

O fluxo venoso portal comparando-se todos os receptores e doadores (526 ± 193 mL / min vs. 828 ± 178 mL / min, $p = 0,0001$), foi significativamente maior nestes últimos (Gráfico 6).



Gráfico 6 – Fluxo venoso portal nos doadores e receptores

Quando comparamos isoladamente receptores e doadores por grupo pudemos perceber que houve diferença nos grupos LFS (890 ± 203 mL / min vs. 458 ± 119 mL / min, $p = 0,0034$) e SHUNT ($1003 \pm 5,3$ mL/min vs. 495 ± 277 mL/min; $p = 0,0031$). No grupo CTRL com doadores de mesmo peso o fluxo portal foi semelhante entre doadores e receptores (680 ± 94 mL / min vs. 630 ± 79 mL / min, $p > 0,4101$) (Gráfico 7 e 8).

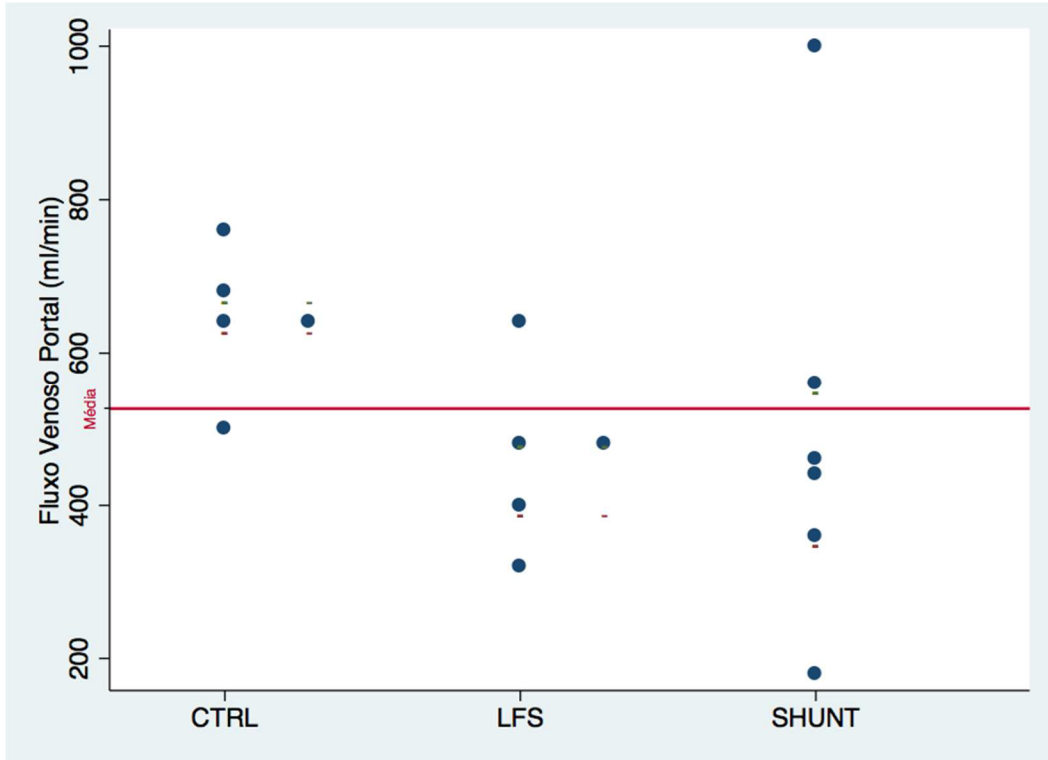


Gráfico 7 – Fluxo venoso portal dos receptores após o transplante por grupo em relação a média (linha vermelha)

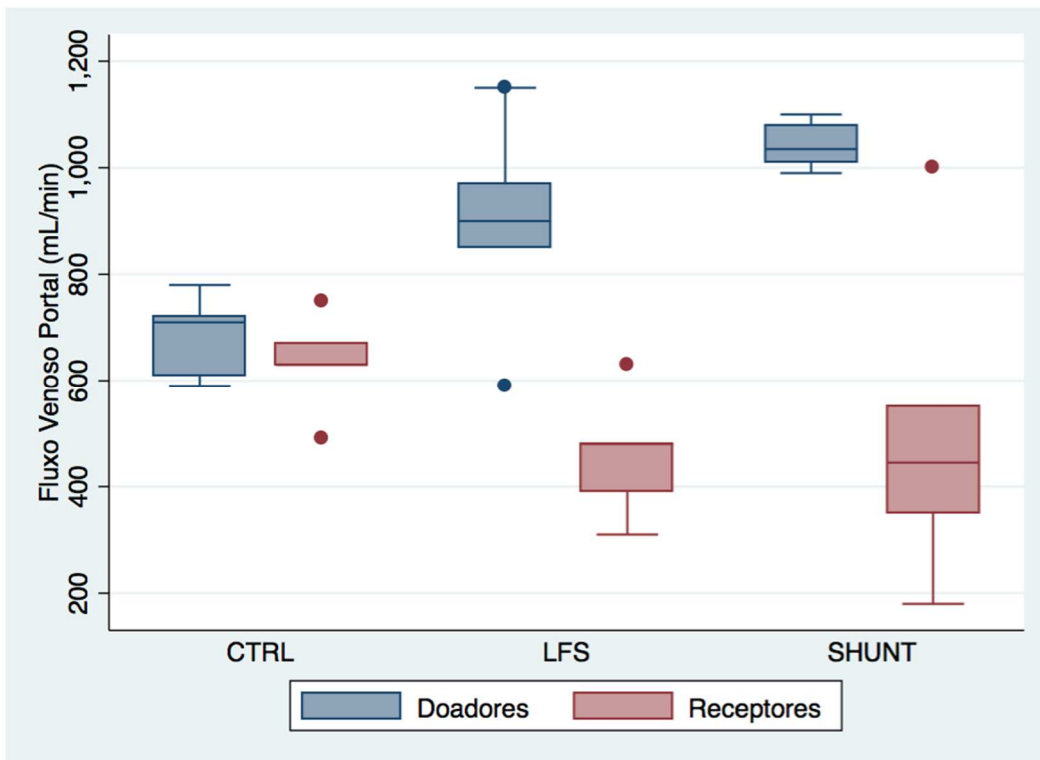


Gráfico 8 – Fluxo venoso portal por grupo, diferença entre doadores e receptores

Para melhor caracterizar essa diferença entre doadores e receptores utilizamos a razão de fluxo venoso portal (rFVP). No grupo CTRL a rFVP se aproximou de um ($0,93 \pm 0,08$). Nos grupos LFS ($0,51 \pm 0,1$) e SHUNT ($0,49 \pm 0,27$) a rFVP foi significativamente mais baixa ($p = 0,01$ e $p = 0,006$) que no grupo CTRL (Gráfico 9).

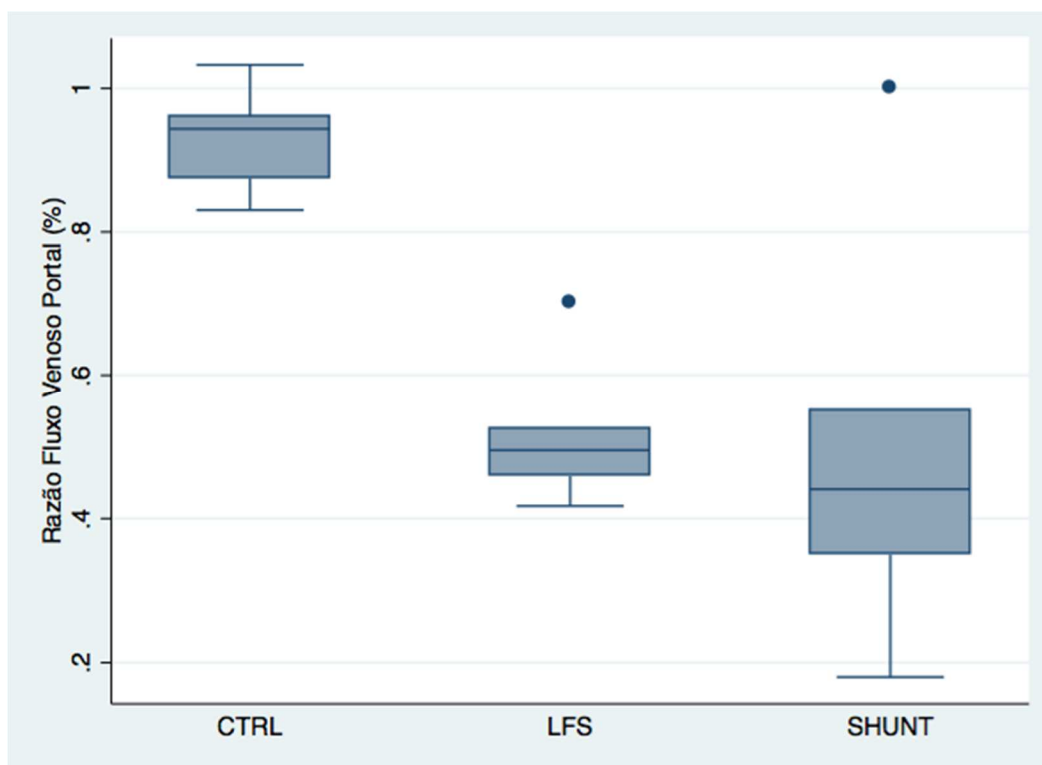


Gráfico 9 – Razão do fluxo venoso portal por grupo

4.3 Resultados do Fluxo Arterial Hepático

Nos grupos CTRL e LFS os receptores não apresentaram diferença em relação ao fluxo sanguíneo na artéria hepática entre si ($151,6 \pm 57,27$ mL / min vs. 146 ± 48 mL / min, $p > 0,05$). (Gráfico 10) No entanto, houve diferença significativa entre as médias quando incluímos o grupo SHUNT na análise, sendo este significativamente diferente do CTRL ($p = 0,02$) e do LFS ($p = 0,029$). Quando comparamos de forma pareada os fluxos

arteriais dos receptores com seus respectivos doadores encontramos diferenças significativas em todos os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 – Média do fluxo arterial hepático por grupo (mL/min)

Grupo	Doador	Receptor	p*
CTRL	258,4	151,6	0,03
LFS	436,4	146,2	0,03
SHUNT	469,17	62,16	0,002

**Teste t de Student (doador vs. receptor)*

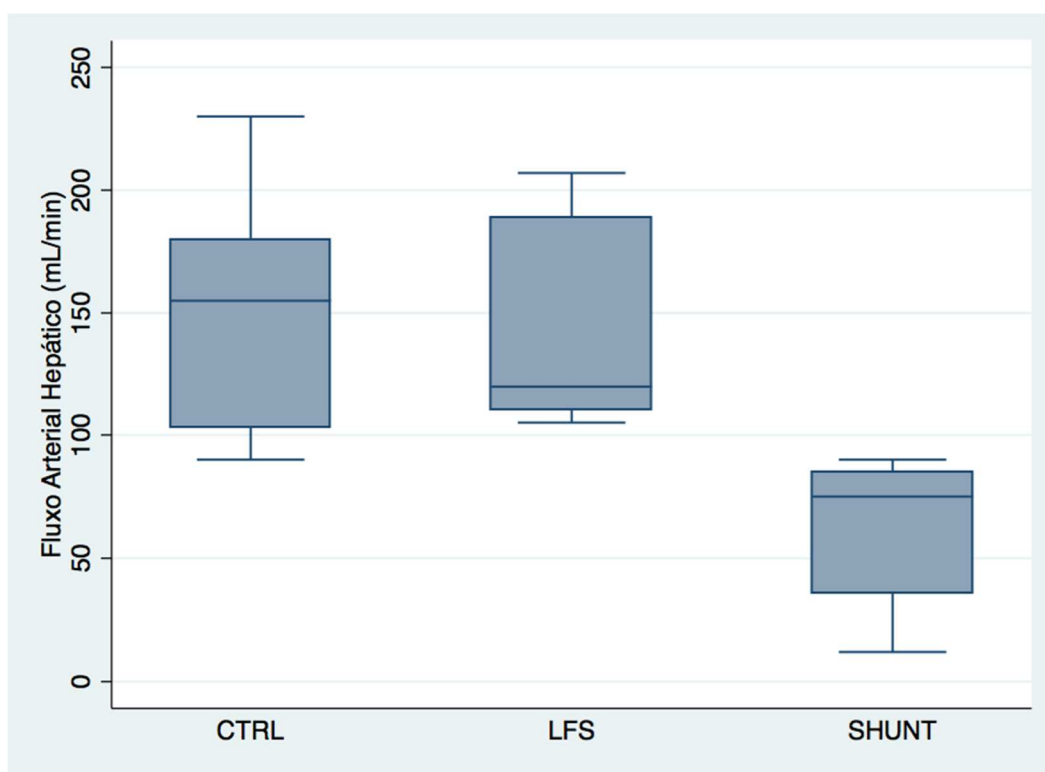


Gráfico 10 – Fluxo arterial hepático por grupo

4.4 Resultados da Análise Histológica

Encontramos na tabela 5 os dados dos resultados referentes a análise semiquantitativa das lâminas coradas em HE dos grupos controle (CTRL), *large-for-Size* (LFS) e *shunt* (SHUNT) em relação aos fatores necrose, inflamação, edema e esteatose.

Tabela 5 – Resultado da análise histológica

		Mediana	Máximo	Mínimo	<i>p</i> *
Inflamação	CTRL	1	2	1	0,06
	LFS	3	3	1	
	SHUNT	1	2	0	
Necrose	CTRL	0	2	0	0,29
	LFS	2	3	0	
	SHUNT	1	1	0	
Edema	CTRL	0	2	0	0,10
	LFS	2	3	0	
	SHUNT	1,5	2	0	
Esteatose	CTRL	2	3	0	0,14
	LFS	2	2	0	
	SHUNT	0	1	0	
IIR	CTRL	3	7	1	0,04
	LFS	7	9	4	
	SHUNT	3,5	5	1	

* *Teste de Kruskal-Wallis*

O índice calculado somando-se todos os outros parâmetros foi diferente entre os grupos mostrando a mediana do grupo LFS como a pior e a lesão dos grupos CTRL e SHUNT em intensidades semelhantes. Os demais parâmetros não apresentaram significância estatística.

4.5 Resultados da Análise Imunoistoquímica

Foi realizada a contagem dos núcleos de hepatócitos TUNEL (+) presentes em cinco campos aleatórios com aumento de 40 vezes em microscópio óptico e feita a proporção destes em relação ao total de núcleos na amostra. Essas proporções foram comparadas entre os grupos CTRL, LFS e SHUNT conforme a tabela 6.

Tabela 6 – Resultado da contagem de núcleos TUNEL (+)

	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	Soma	<i>p</i>
CTRL	16	7	20	14,2	71	
LFS	16	10	29	17,4	87	0,87
SHUNT	15,5	4	25	14,7	88	
Total	16	4	29	15,37	246	

4.6 Resultados da Análise Molecular

Os dados obtidos pela análise da quantificação relativa da expressão gênica (valores de $2^{-\Delta\Delta ct}$) após 1 hora de reperfusão nos animais dos grupos Controle (CTRL), *Large-for-size* (LFS) e *shunt* (SHUNT) pelo método do RT-PCR Real Time para cada um dos genes estudados são observados na tabela 7 com as respectivas médias e valores de *p*.

Observamos que houve aumento na expressão do gene pró-apoptótico *Bax* no grupo SHUNT quando comparado ao grupo CTRL. Em relação ao gene da IL-6, houve um aumento significativo de sua expressão nos grupos LFS e SHUNT. De forma oposta, o gene da *eNOS* foi mais expresso no grupo LFS que nos demais grupos.

Tabela 7 – Análise dos resultados da biologia molecular

		Média	p*
<i>Bax</i>	CTRL	0,21†	0,002
	LFS	0,54	
	SHUNT	0,79†	
<i>BCL-XL</i>	CTRL	1,08	0,958
	LFS	0,89	
	SHUNT	1,17	
<i>eNOS</i>	CTRL	0,40	0,009
	LFS	1,77	
	SHUNT	0,17	
<i>IL-6</i>	CTRL	4,66	0,05
	LFS	16,21	
	SHUNT	12,69	
<i>ICAM</i>	CTRL	0,18	0,66
	LFS	0,54	
	SHUNT	1,11	
<i>iNOS</i>	CTRL	0,11	0,79
	LFS	0,98	
	SHUNT	0,61	
<i>c-fos</i>	CTRL	0,93	0,6
	LFS	0,27	
	SHUNT	0,93	
<i>c-jun</i>	CTRL	0,42	0,78
	LFS	1,03	
	SHUNT	0,74	
<i>TNF-α</i>	CTRL	0,78	0,34
	LFS	1,33	
	SHUNT	1,23	

*ANOVA oneway com pós teste de Bonferroni

Realizamos a regressão linear univariada do resultado da quantificação da expressão gênica como variável dependente em função da razão de fluxos venosos portais doador/receptor. Dos genes relacionados a apoptose o Bax demonstrou uma clara relação com a rFVP ($R^2 = 0,32$; $p = 0,025$) enquanto que os demais modelos não atingiram significância estatística (Gráfico 11).

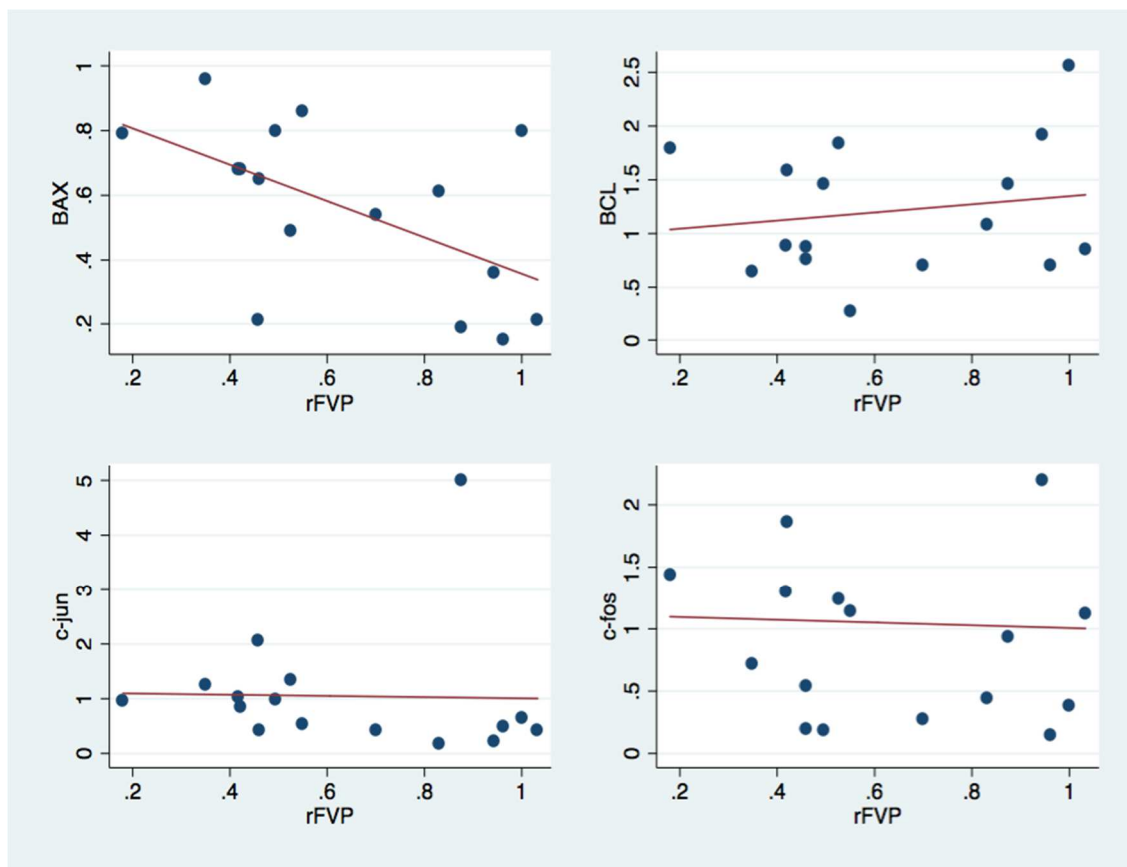


Gráfico 11 – Gráfico de pontos e modelo de regressão linear ajustado (linha vermelha) dos genes relacionados a apoptose e da razão de fluxos venosos portais (rFVP) como variável independente.

A IL-6 apesar de mostrar diferença entre os grupos não foi possível verificar matematicamente sua relação com a redução do fluxo venoso portal no receptor ($R^2 = 0,16$; $p = 0,123$) provavelmente devido a presença de dois *outliers* (Gráfico 12).

A eNOS apesar de apresentar uma tendência a se reduzir com a melhora da rFVP não atingiu significância estatística no modelo apresentado ($R^2 = 0,14$; $p = 0,056$). No entanto, quando realizado a comparação entre os grupos, o eNOS foi significativamente mais elevado no grupo LFS em comparação aos demais ($p = 0,009$). A iNOS não apresentou as mesmas características da sua análoga endotelial e seguiu sem diferença entre os grupos e sem uma tendência clara de relação com o fluxo venoso portal (Gráfico

13 e 14). Nas demais variáveis a inclinação da curva do TNF- α também apresentou significância estatística ($R^2 = 0,23$; $p = 0,024$). (Gráfico 14)

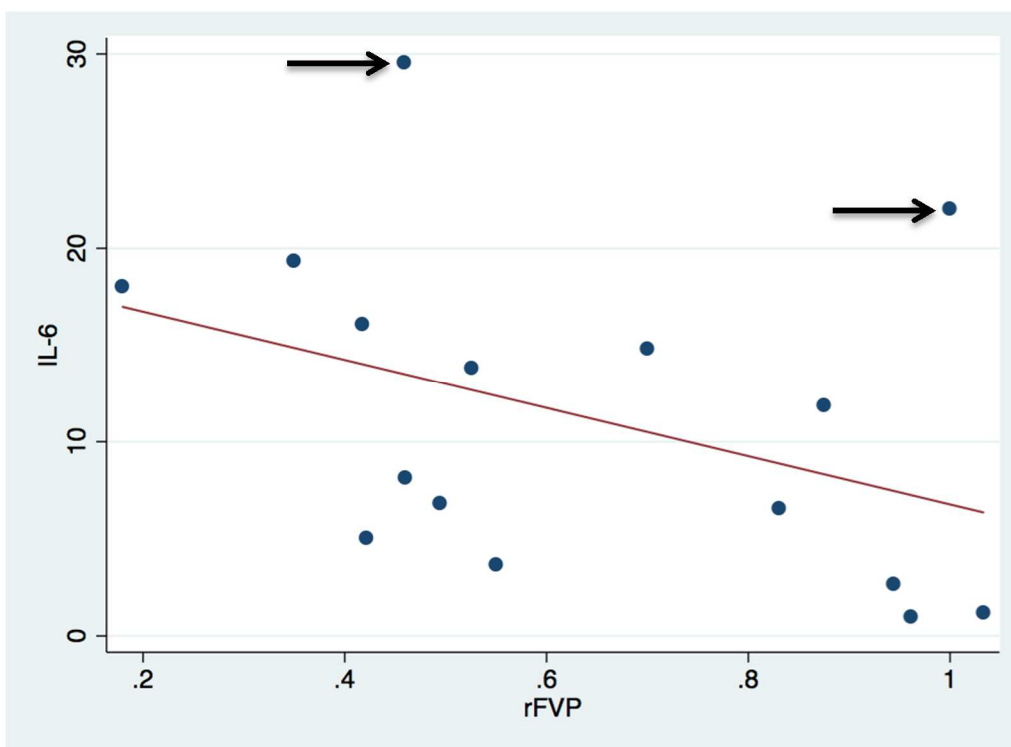


Gráfico 12 – Gráfico de pontos e modelo de regressão linear ajustado (linha vermelha) do gene da IL-6 e da razão de fluxos venosos portais (rFVP) como variável independente. *Outliers* marcados com seta.

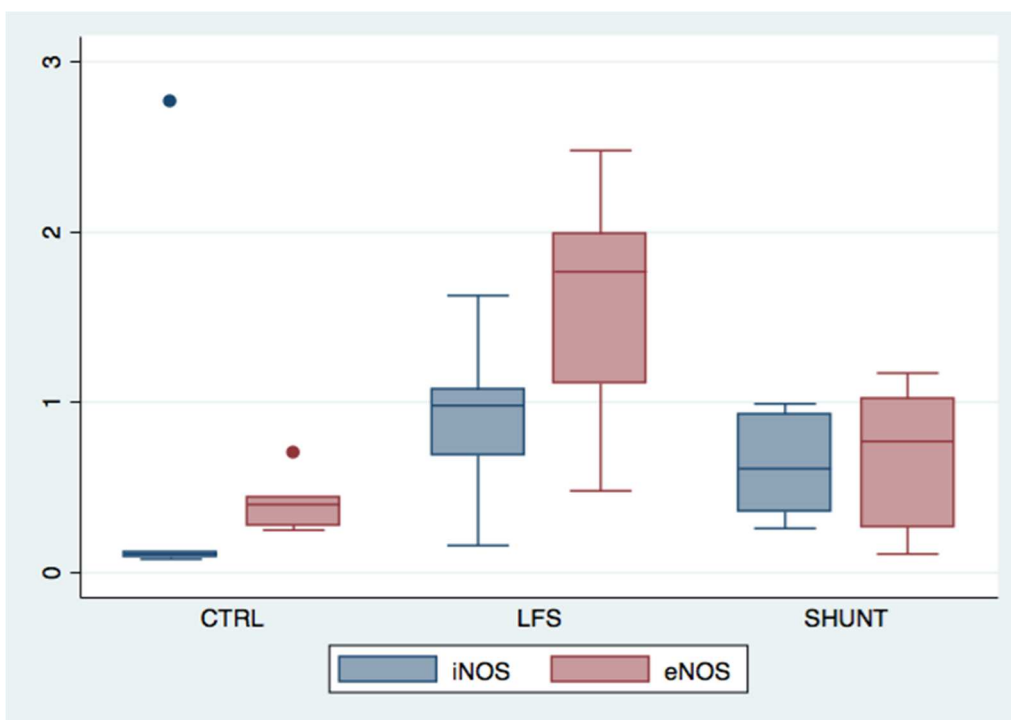


Gráfico 13 – Intensidade da expressão dos genes relacionados a produção do Óxido Nítrico.

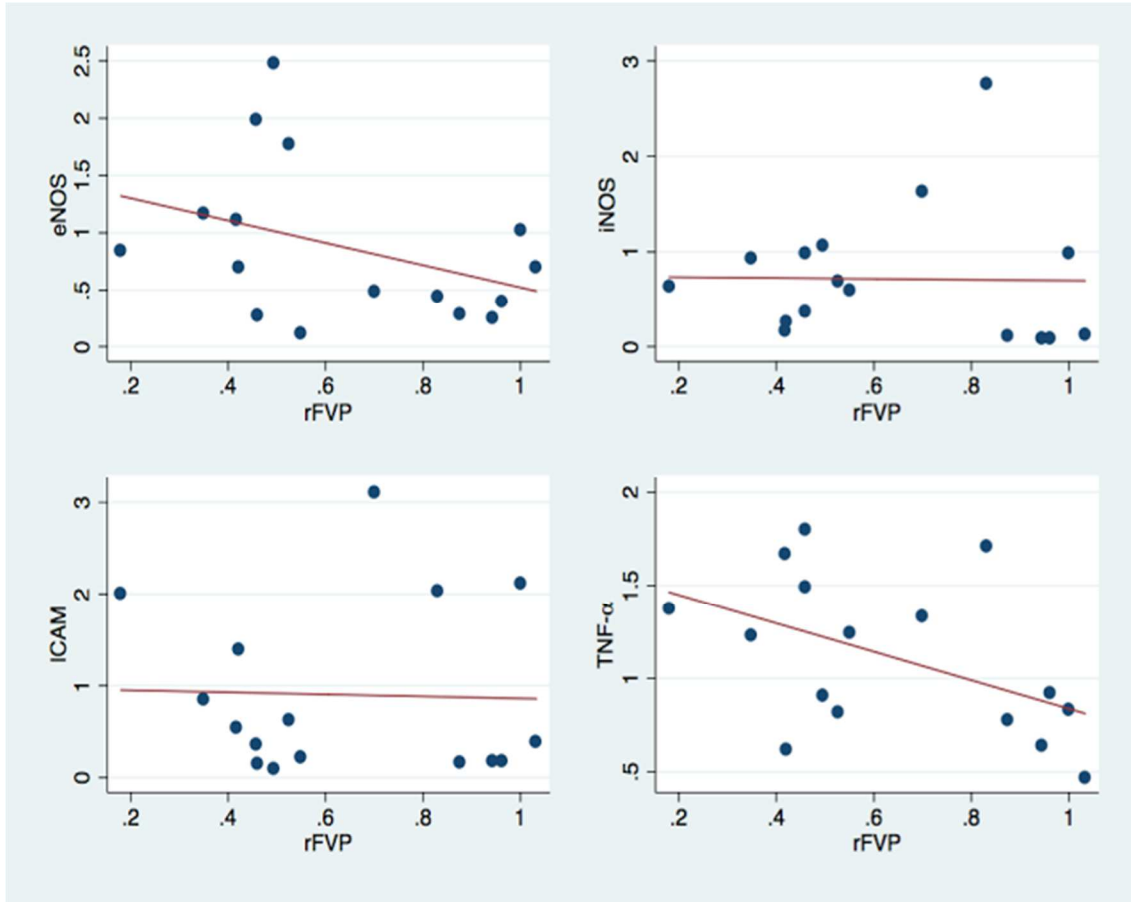


Gráfico 14 – Gráfico de pontos e modelo de regressão linear ajustado (linha vermelha) dos genes eNOS (endotelial nitric oxide synthase), iNOS (inducible nitric oxide synthase), ICAM (intercellular adhesion molecule/CD54), TNF- α e da razão de fluxos venosos portais (rFVP) como variável independente.

5 – Discussão

Na maioria dos grandes centros a principal indicação do transplante hepático pediátrico é a atresia de vias biliares, condição que costuma evoluir no curso da doença com hipoplasia da veia porta, culminando em trombose e transformação cavernomatosa ou fluxo hepatofugal, o que torna o transplante hepático pediátrico um desafio tecnicamente mais difícil e muitas vezes mais mórbido por si só(40).

A realização de transplantes em crianças com desproporção entre o receptor e o tamanho do enxerto, ou seja, com índice de peso do fígado sobre peso de receptor (GBWR) maior do que 4%, vem crescendo ao longo do tempo. Na medida em que conseguimos melhorar os resultados dos métodos já existentes e cada vez mais transplantar crianças menores, com menos idade e com doença hepática ainda sob relativo controle. O viés desta tendência é o desafio técnico de se adequar enxertos tão pequenos e realizar anastomoses em vasos de calibres milimétricos.

Um dos sinais apresentados por essa tendência pode ser visto no aparecimento de inúmeros trabalhos na última década mostrando o desenvolvimento técnico e as formas de se implantar enxertos de segmento lateral esquerdo reduzido, monosegmentos hepáticos e segmentos hiper-reduzidos(41-44). Estes trabalhos são relatos e séries de casos de transplantes com enxerto muito reduzido, onde são implantados um único segmento hepático na cavidade abdominal do receptor, geralmente o segmento II ou III(45, 46).

Apesar de descrito como de fácil execução, existem consequências em se ter duas áreas cruentas no caso de enxertos do segmento III, como maior chance de sangramentos e de vazamentos de bile. Já no preparo dos enxertos de segmento II as potenciais complicações são devidas à necessidade de dissecação do pedículo hepático na bifurcação dos segmentos II e III acarretando um potencial iatrogênico maior. Independente das dificuldades técnicas ainda não se pode comparar os resultados a longo prazo e a

morbidade desses pacientes com os pacientes que receberam enxertos com tamanho adequado ou acima de 4%, de maneira que ainda são necessárias maiores evidências clínicas em uma escala maior para se tornarem de uso rotineiro nos lactentes e escolares.

O baixo fluxo portal contribui para piorar a reperfusão da microvasculatura hepática após o transplante e aumenta a chance de trombose do mesmo(47, 48). Tal problema é ainda mais pronunciado no fígado *large-for-size*, que possui uma maior demanda metabólica. Desta forma, em adição a outros fatores, como a lesão de isquemia-reperfusão e a síndrome compartimental abdominal causada pelo edema e efeito de massa do órgão grande na cavidade abdominal pequena, o fluxo portal diminuído só agrava a situação e contribui para um resultado pior no transplante(49, 50).

Além da regulação clássica do fluxo, isto é uma vasoconstrição em resposta a queda de pressão no compartimento arterial, o fluxo arterial hepático apresenta, de forma peculiar, variações em resposta ao fluxo venoso portal efeito este conhecido com resposta tampão da artéria hepática (*Hepatic Artery Buffer Response – HABR*), ou seja, pode ocorrer vasoconstrição ou vasodilatação no território irrigado pela artéria hepática em resposta a um baixo fluxo venoso portal(7, 51).

A boa adequação entre a quantidade de parênquima hepático implantada e a quantidade de fluxo venoso e arterial que se tem no receptor tem importância imediata e tardia. Pratschke *et al*, identificaram a importância da hemodinâmica hepática para o resultado do transplante. O baixo fluxo na artéria hepática é um fator de risco independente para não funcionamento primário do enxerto e fluxo venoso portal < 1300 mL/min na análise univariada se mostrou como fator de risco para maior chance de perda do enxerto(52).

Apesar das evidências em contrário, alguns autores acreditam que os efeitos do *large-for-size* são imediatos e totalmente dependentes da relação tamanho do enxerto vs.

tamanho da cavidade (continente/conteúdo), e que a adequação do tamanho do enxerto às características do receptor pode ser colocada em um patamar secundário no transplante hepático. Schulze *et al*, relataram uma série de casos na qual não há diferença nas complicações pós-operatórias quando comparados os resultados dos transplantes *large-for-size* com os das crianças que recebiam enxertos de tamanho adequado sugerindo que os transplantes com enxertos monosegmentares são irrelevantes. No entanto, o foco daquele estudo foi avaliar as complicações vasculares e biliares precoces, perfurações intestinais e tempo de internação pós-transplante(21). Não foram avaliadas as consequências da lesão de isquemia-reperfusão, nem os resultados de transplante a longo prazo. Neste sentido, Kiuchi *et al*, identificaram uma elevação significativa nos níveis séricos de AST no período pós-transplante precoce e um maior índice de perda do enxerto nos transplantes em que o GBWR ultrapassava 5%. Neste mesmo trabalho foi encontrada uma maior chance de rejeição aguda no primeiro mês pós transplante dessas crianças. O autor sugeriu como hipótese que a grande quantidade de células apresentadoras de antígenos poderiam ativar o sistema imunológico do receptor com maior facilidade(8).

Existe descrição de um modelo que usa o índice da superfície corpórea entre doador e receptor como um preditor de transplante *small-for-size* ou *large-for-size*. Apesar de só terem sido incluídos receptores adultos, este amplo estudo com mais de 20.000 casos mostrou um maior índice de perda do enxerto e de mortalidade em receptores de um fígado pequeno ou grande demais(53, 54).

Um grande estudo populacional realizado com o banco de dados do UNOS (*United Network for Organ Sharing*), instituição que coordena a procura de órgãos nos Estados Unidos da América, coletou dados referentes a todos os transplantes realizados em crianças com peso inferior a 5kg no período de outubro de 1987 a maio de 2008 e demonstrou através de curvas de sobrevida que os índices de perda de enxerto e

mortalidade foram maiores neste grupo de crianças e que apesar destes números, esses índices estão melhorando ao longo das décadas. Em contrapartida a este estudo, Chung *et al*, analisaram os resultados de seu serviço em Hong Kong na China de 1993 a 2011 e mostraram que os 113 pacientes que foram transplantados com menos de 6 kg foram os que tiveram menores taxas de mortalidade e de sobrevida dentre todas as faixas de peso pediátricas estipuladas no estudo alertando que o peso corporal do recipiente não é relevante para o desfecho do transplante hepático ou complicações relacionadas(20, 55). O que não foi levado em conta em ambos os trabalhos foi a adequação do tamanho do enxerto ao tamanho do receptor o que provavelmente poderia explicar esta disparidade de achados em trabalhos com amostras tão substanciais de pacientes com baixo peso corpóreo.

Fica claro, portanto, que apesar do paciente pediátrico estar presente no desenvolvimento do transplante desde o primeiro procedimento realizado até os dias de hoje onde o transplante hepático é realizado em grande escala, ainda existe muito a se avançar sobre a adequação do enxerto e do *large-for-size* e, como causa disso, poderíamos citar o pequeno número de pacientes com menos de 10 kg que são transplantados anualmente e a multiplicidade de tipos e técnicas de transplantes que podem ser realizados nesses pacientes as vezes tornando difícil a comparação entre os grupos existentes no mundo.

Apesar de não ser observada insuficiência hepática nos transplantes *large-for-size*, como é observado nos transplantes *small-for-size*, o transplante com fígado grande parece ter um espectro mais complexo de consequências que poderiam ser divididas em 2 fases. A fase inicial é definida pelo efeito mecânico do enxerto grande na pressão intra-abdominal. Esta hipertensão abdominal e, em algumas situações, síndrome compartimental abdominal leva a obstrução da veia cava e fluxo portal diminuído que

parece exacerbar a lesão de isquemia-reperfusão além da insuficiência renal pelo baixo fluxo renal com conseqüente retenção de líquidos e, de forma cíclica, piora da pressão intra-abdominal culminando em casos extremos na necrose maciça do enxerto, insuficiência respiratória, acidose e morte(56). Esses fenômenos precoces da síndrome *large-for-size* parecem ser atenuados ou até extinguidos pela manutenção da cavidade abdominal aberta no período pós-operatório. O segundo período parece ser caracterizado pelas conseqüências tardias da lesão de isquemia-reperfusão exacerbada previamente descritas, levando a necrose e reabsorção do excedente da massa de hepatócitos. Tal fenômeno contribuiria para os maiores índices de rejeição celular aguda, complicações biliares, rejeição crônica, retransplante e perda de enxerto a longo prazo. Apesar de dados irregulares mostrarem isso, ainda não se pode estabelecer uma relação causal somente com o tamanho do enxerto sem se levar em conta a adequação do aporte sanguíneo do receptor à massa de hepatócitos a ser implantada e do quadro clínico do paciente previamente ao transplante. Apesar de parecer óbvio que uma massa de 100 g de fígado submetida a um fluxo de 120 mL / min em um determinado doador – somando-se o fluxo venoso portal e arterial hepático – deverá ser submetido a este mesmo aporte sanguíneo no receptor isto nem sempre é possível do ponto de vista do transplante hepático pediátrico e determinar o limite aceitável que diminua o dano para o paciente e mecanismos de reversão ou atenuação desses danos deve ser o caminho a ser seguido.

Para caracterizar o modelo como representativo do que ocorre no cotidiano do transplante hepático pediátrico utilizamos um modelo em grandes animais seguindo a linha de pesquisa já existente em nosso grupo. Previamente foi descrito um modelo porcino de transplante hepático LFS usado para estudar as alterações que ocorriam precocemente nos enxertos grandes e seus receptores. Neste modelo, estudou-se também os efeitos imediatos do pré-condicionamento isquêmico no transplante LFS por meio de

métodos histológicos, bioquímicos e moleculares. Assim, utilizamos a experiência anterior e a aperfeiçoamos de acordo com outras descrições que também simplificavam o método de transplante hepático em grandes animais e o utilizamos para acessar as fases precoces da lesão de isquemia-reperfusão em transplantes(22, 38).

Com exceção do peso e da hemoglobina os demais parâmetros dos doadores mostraram-se homogêneos entre os grupos. Os níveis de hemoglobina menores nos doadores do grupo CTRL é justificado por esses animais terem sido recém-desmamados, passando pela fase da anemia que ocorre devido ao grande crescimento somático e baixa biodisponibilidade do ferro da dieta além da destruição da hemoglobina fetal e sua substituição pela forma adulta. O peso significativamente maior nos grupos LFS e SHUNT se refletiu em maiores enxertos nestes grupos como mostra o Gráfico 10. Devido a isso, o GBWR foi significativamente maior e apresentou uma relação diretamente proporcional com o peso do enxerto (Gráfico 11), garantindo que animais maiores forneceram enxertos maiores para seus receptores.

Os valores calculados dos parâmetros metabólicos hepáticos não alcançaram diferença entre os grupos, mas é possível observar que houve uma tendência de melhor oferta de O₂ (DO₂H) para os enxertos do grupo CTRL quando comparamos com os demais (Tabela 3). No grupo SHUNT o conteúdo portal de O₂ mostrou-se menor que os demais grupos talvez devido a parte do fluxo sanguíneo vinda da veia cava inferior com baixa pressão parcial de O₂. O pH significativamente mais baixo no grupo LFS é reflexo da má perfusão tecidual e do choque mantido pela dificuldade em se perfundir e recuperar da fase anepática.

Observamos que os grupos LFS e SHUNT apresentaram uma tendência a maiores níveis de AST no entanto sem significância estatística entre os grupos (Tabela 3). No entanto, existe uma diferença significante entre as médias de AST dos grupos CTRL e

LFS. A ALT por ser liberada mais tardiamente após o insulto hepatocitário manteve-se com valores indistinguíveis entre os grupos. O SHUNT pareceu apaziguar alguns dos efeitos deletérios, evidenciando valores intermediários entre o grupo controle e grupo LFS, porém todos sem significância do ponto de vista estatístico. O aumento efêmero do fluxo portal obtido com o *shunt* pode ter sido responsável por explicar esta tendência observada, uma vez que, pelo menos temporariamente, conseguiu perfundir melhor o enxerto recém implantado.

Como era esperado o fluxo venoso portal foi maior nos doadores em comparação com os receptores uma vez que este último foi aferido após 1 hora do choque que ocorria durante o clampeamento da veia cava inferior e os doadores com o animal recém anestesiado (Gráfico 14). No entanto, quando comparamos grupo a grupo, o CTRL não mostrou diferença entre os doadores e receptores enquanto os demais grupos obtiveram valores muito diferentes dos aferidos em seus respectivos doadores. A análise fluxométrica após 1 hora da reperfusão demonstrou uma queda significativa no fluxo venoso portal nos receptores dos transplantes LFS em relação aos do grupo controle e a presença do *shunt* não foi capaz de reverter esta redução. Quando analisamos a razão de fluxos receptores/doadores vemos que o *shunt* também não foi capaz de melhorar o fluxo venoso portal do receptor frente ao doador (Gráfico 17). O rFVP do grupo CTRL ficou significativamente mais alto e próximo a um, significando que em média os receptores do grupo CTRL mostraram fluxo venoso portal de cerca de 90% dos observados em seus respectivos doadores. Existem consequências sistêmicas danosas para o organismo como um todo quando diminuimos o retorno venoso através da veia cava com intuito de direcionarmos o fluxo sanguíneo em direção ao *shunt* e conseqüentemente em direção a veia porta. Nos suínos a dependência do retorno venoso da cava inferior é uma das causas

que dificultam tecnicamente o uso desta espécie nos experimentos de transplante hepático(57).

Desta forma, o que observamos é que, apesar de tentarmos direcionar o fluxo da veia cava inferior para a veia porta através do *shunt* com obstrução da cava acima do mesmo, não conseguimos aumentar o fluxo portal para o fígado desproporcionalmente grande após 1 hora da reperfusão. No entanto, quando o fluxo era aferido logo após a reperfusão do órgão havia um aumento não mantido do fluxo portal. Assim, talvez devido à grande complacência do sistema venoso, seguia-se um progressivo represamento e congestão do sangue em território sistêmico e mesentérico, com queda do fluxo para a veia porta caía ao longo do tempo e após 1 hora já se apresentava em níveis semelhantes ao do grupo LFS e em alguns casos até menor. Possivelmente, o aumento efêmero do fluxo portal possa ter sido responsável pela atenuação, ao menos parcial, da lesão histológica, pois a intensidade das alterações quando consideradas em conjunto (inflamação, necrose, edema e esteatose) foi maior no grupo LFS que no controle e no SHUNT.

O fluxo arterial hepático foi significativamente menor nos receptores de uma maneira geral e no grupo SHUNT em comparação com os demais. Acreditamos que o represamento do sangue no território venoso da veia cava inferior deva ter sido o responsável pela diminuição do retorno venoso, débito cardíaco e portanto de fluxo arterial hepático no grupo SHUNT. (Gráfico 18).

Talvez, se o intervalo de tempo de observação pós-operatória fosse mais prolongado, as diferenças entre os grupos controle e LFS pudessem ser mais nítidas e consistentes, podendo serem evidenciadas diferenças estatisticamente significantes, como no caso da contagem de hepatócitos TUNEL positivos, que não mostrou diferença entre a quantidade de células apoptóticas nos diferentes grupos.

A lesão de isquemia-reperfusão é a principal causa de disfunção primária após o transplante e contribui para a diminuição de tempo de sobrevida do enxerto e do receptor. Assim, a identificação de fatores que possam aumentar a lesão tecidual e medidas que possam atenuá-la são essenciais para a melhora da sobrevida após o transplante hepático(58). Na lesão de isquemia-reperfusão, a morte celular se dá pelos processos de necrose e apoptose. Sabe-se que o processo de apoptose, ou morte celular programada, é o resultado entre o balanço da expressão de genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos. Em nosso estudo, observamos que houve aumento na expressão do gene pró-apoptótico *Bax* nos grupos com fígado *large-for-size*; mostrando uma tendência a maior lesão hepatocelular nestes transplantes. No grupo SHUNT houve maior expressão deste gene do que no grupo LFS, contribuindo para a hipótese de que o *shunt* não conseguiu diminuir o processo de apoptose nos hepatócitos do órgão desproporcionalmente grande.

A interleucina-6 (IL-6) é uma potente molécula pró-inflamatória envolvida nas fases iniciais da regeneração hepática, cuja expressão é deflagrada nas fases precoces no processo de isquemia-reperfusão. Trabalhos em modelos animais de *small-for-size* têm relacionado a intensidade da expressão desta molécula com a intensidade dos efeitos do alto fluxo portal de maneira que o alto fluxo bloqueia seus efeitos nos sítios de ação intensificando sua produção e bloqueando o processo regenerativo que ocorre normalmente no pós operatório do transplante hepático(16, 59). Assim sendo o aumento na intensidade da expressão do gene da IL-6 nos casos mais graves de *large-for-size* pode estar relacionado a um maior bloqueio na sua atividade regenerativa pelo hipofluxo portal de maneira semelhante a síndrome *small-for-size*. É interessante ainda notar que no presente trabalho esta molécula esteve relacionada de maneira proporcional mas não estatisticamente significativa com melhores fluxos venosos portais no receptor e melhores razões de fluxo doador/receptor (rFVP).

Vários modelos animais em ratos demonstraram que o óxido nítrico sintetizado pela eNOS (óxido-nítrico sintetase endotelial) tem um efeito protetor contra a lesão de isquemia-reperfusão(37). O óxido nítrico derivado da eNOS melhora a microcirculação e diminui os índices de apoptose após o transplante hepático em ratos. O aumento da expressão de eNOS no grupo LFS pode corresponder a um mecanismo protetor do organismo no sentido de amenizar a lesão de isquemia-reperfusão mais acentuada neste grupo. A expressão deste gene também manteve uma relação proporcional com a razão de fluxos venosos portais. A influência do *shunt* na baixa expressão da eNOS no grupo SHUNT é discutível uma vez que o mesmo não foi capaz de aumentar significativamente o fluxo venoso portal. É possível ainda, que existam outros mecanismos pelo qual o *shunt* mesentéricocava possa proteger o fígado dos efeitos da lesão de isquemia e reperfusão.

Como limitações do presente estudo podemos incluir o tempo de observação dos animais no pós operatório o que pode ser implicado em diferenças pouco significativas ou inexistentes em aspectos que ocorrem mais tardiamente na lesão de isquemia e reperfusão hepática. Devido à complexidade dos procedimentos, às perdas relacionadas aos óbitos dos receptores e baseados em outros trabalhos da literatura, estabelecemos uma amostra de 5 a 6 transplantes por grupo. Possivelmente, se o número de animais por grupo fosse maior, encontraríamos diferenças estatisticamente significantes na análise dos genes de expressão imediata (c-fos e c-jun, cujo balanço coordena os processos de regeneração e apoptose após a lesão de isquemia-reperfusão), do gene das moléculas de adesão (precocemente expressas após a isquemia-reperfusão), da iNOS (óxido-nítrico sintetase induzível, produtora de óxido nítrico em níveis deletérios) e do TNF- α (importante citocina pró-inflamatória).

No entanto, nas condições da presente pesquisa, pudemos concluir que, no modelo de transplante *large-for-size* porcino, a colocação de um fígado desproporcionalmente

grande leva a um hipofluxo portal relativo, ou seja, apesar de normal para o tamanho do receptor ele é insuficiente para o enxerto recém implantado, e isto pode estar relacionado a um maior dano hepatocitário com acentuação da lesão de isquemia-reperfusão. A presença de um *shunt* entre a veia cava e a veia porta, tentando direcionar o fluxo da circulação sistêmica para a portal não conseguiu aumentar o influxo de sangue para o fígado desproporcionalmente grande de forma definitiva. No entanto, um fugaz aumento do influxo portal pode ser responsável por uma atenuação parcial das lesões relacionadas ao transplante *large-for-size*.

6 – Conclusões

O presente estudo foi capaz de:

- 1- Caracterizar as relações fluxométricas encontradas no modelo *large-for-size* porcino. Foi demonstrada uma diferença expressiva entre os fluxos sanguíneos que adentram o fígado no grupo controle quando comparado aos demais grupos, mostrando que relativamente e em algumas situações ocorre hipofluxo para o enxerto quando o mesmo é demasiadamente grande para o receptor.
 - 2- Constatar que do ponto de vista histológico a lesão tecidual foi mais intensa nos experimentos que apresentaram menor fluxo venoso portal – absoluto ou relativo. Na fase aguda desta lesão não foi possível transpor essa mesma observação quando utilizamos o parâmetro imunohistoquímico. O baixo fluxo venoso portal foi capaz de alterar a medida dos níveis de algumas interleucinas inflamatórias e da aspartato aminotransferase. Essas alterações mostraram proporcionalidade com a diferença do fluxo venoso portal do doador e receptor.
 - 3- Identificar que a modulação do fluxo venoso portal não foi capaz de reverter as lesões agudas, após 1h de observação, que ocorreram quando implantamos um fígado *large-for-size*. As repercussões negativas causadas pela diminuição do retorno venoso que flui através da veia cava inferior tentando direcioná-lo no sentido da veia porta e do enxerto recém implantado são maiores que o benefício ocasionado
-

pelo aumento do fluxo venoso portal. Esses efeitos negativos do choque parecem ser os responsáveis por um desempenho pior desses animais frente ao insulto ocasionando conseqüentemente lesão de isquemia e reperfusão hepática semelhante e algumas vezes pior que o grupo LFS.

7 – Anexos

Anexo A – Aprovação CEUA – CEP – FMUSP**APROVAÇÃO**

O Coordenador da CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **30.05.2012**, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **123/12** intitulado: **"TRANSPLANTE HEPÁTICO "LARGE FOR SIZE" PORCINO COM MANIPULAÇÃO DO FLUXO VENOSO PORTAL: UM ESTUDO HEMODINÂMICO, HISTOLÓGICO E BIOMOLECULAR"** que utilizará **60 porcos**, apresentado pelo **Departamento de Cirurgia**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Ana Cristina Aoun Tannuri

Pesquisador (a) Executante: Daniel de Albuquerque Rangel Moreira

CEP-FMUSP, 30 de maio de 2012.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004
mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

Anexo B – Tabela de campo

Experimento N°

Data:

Doador		Receptor	
Sexo:		Sexo:	
Peso Animal:		Peso Animal:	
Peso Enxerto:		Peso Explante:	
Dados,do,Transplante:	Clamp do Doador:	Revasc. Cava Inf.:	
	Clamp do Receptor:	Revasc. Art.:	
	Revascularização da Porta:	Liq. Infundido.:	
	TGO/TGP:		
	DOADOR	RECEPTOR	
FLUXOS,E,PRESSÕES			
FAH			
FVP			
PAM			
PVP			
PVH			
GASOMETRIA,ARTERIAL			
Ph			
BIC			
PCO2			
PaO2			
Lactato			
SpO2			
GASOMETRIA,PORTAL			
Ph			
BIC			
PCO2			
PaO2			
Lactato			
SpO2			
GASOMETRIA,V.,HEPÁTICA			
Ph			
BIC			
PCO2			
PaO2			
Lactato			
SpO2			

Anexo C – Dados experimentais

Tabela C1 – Fluxos e pressões aferidos no grupo controle (CTRL)

		FAH	FVP	PAM	PVP	PVH
1	Doador	113	720	76	13	12
	Receptor	90	630	63	13	12
2	Doador	378	590	64	15	14
	Receptor	103	490	64	16	13
3	Doador	330	780	63	13	12
	Receptor	230	750	81	15	13
4	Doador	255	610	63	12	11
	Receptor	155	630	58	13	9
5	Doador	216	710	59	13	12
	Receptor	180	670	64	12	10

FAH – fluxo da artéria hepática (mL/min), FVP – fluxo da veia porta (mL/min), PAM – pressão arterial média (mmHg), PVP – pressão na veia porta (mmHg), PVH – pressão na veia hepática (mmHg)

Tabela C2 - Fluxos e pressões aferidos no grupo *Large-for-Size* (LFS)

		FAH	FVP	PAM	PVP	PVH
1	Doador	310	1150	73	12	11
	Receptor	189	480	52	8	6
2	Doador	318	900	74	10	8
	Receptor	110	630	55	15	13
3	Doador	460	850	89	13	12
	Receptor	120	390	64	5	3
4	Doador	800	970	83	14	10
	Receptor	105	480	57	13	9
5	Doador	294	590	72	13	11
	Receptor	207	310	76	10	9

FAH – fluxo da artéria hepática (mL/min), FVP – fluxo da veia porta (mL/min), PAM – pressão arterial média (mmHg), PVP – pressão na veia porta (mmHg), PVH – pressão na veia hepática (mmHg)

Tabela C3 - Fluxos e pressões aferidos no grupo SHUNT

		FAH	FVP	PAM	PVP	PVH
1	Doador	440	1000	63	7	7
	Receptor	70	460	40	9	7
2	Doador	700	1000	92	12	12
	Receptor	90	350	47	9	7
3	Doador	255	1000	72	15	13
	Receptor	85	550	58	14	11
4	Doador	510	1000	72	6	4
	Receptor	11	1000	60	13	7
5	Doador	510	1020	76	6	4
	Receptor	36	430	65	12	7

6	Doador	400	1000	79	12	11
	Receptor	80	180	48	9	4

FAH – fluxo da artéria hepática (mL/min), FVP – fluxo da veia porta (mL/min), PAM – pressão arterial média (mmHg), PVP – pressão na veia porta (mmHg), PVH – pressão na veia hepática (mmHg)

Tabela C4 – Gasometria arterial no grupo controle (CTRL)

		pH	BIC	PCO ₂	PO ₂	SO ₂	Hb
1	Doador	7,463	26,4	37,4	426	100	10,2
	Receptor	7,264	21,6	49,5	153	99,3	13,4
2	Doador	7,42	25,2	39,3	407	99,4	8,8
	Receptor	7,242	15,2	36,6	282	100	9,7
3	Doador	7,551	21	24	321	100	9,3
	Receptor	7,398	21,3	35,4	204	100	13,4
4	Doador	7,462	25,4	36	363	100	9,5
	Receptor	7,228	14,2	35,3	141	99,3	12,9
5	Doador	7,437	25,7	38,8	356	99,9	9,3
	Receptor	7,355	18,2	33,4	219	100	11,5

pH – Potencial de Hidrogênio, BIC – Íon bicarbonato (mmol/L), PCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico (mmHg), PO₂ – Pressão parcial de oxigênio, SO₂ – Saturação de oxigênio (%)

Tabela C5 – Gasometria arterial no grupo *Large-for-Size* (LFS)

		pH	BIC	PCO ₂	PO ₂	SO ₂	Hb
1	Doador	7,365	29,4	52,7	346	100	12,4
	Receptor	7,188	19,3	52,9	224	100	13,8
2	Doador	7,434	27,7	42,1	214	99,5	10,2
	Receptor	7,13	18,9	59,4	199	99,7	12,8
3	Doador	7,368	26,7	47,5	380	100	11,7
	Receptor	7,076	15,4	55	183	99,6	14,4
4	Doador	7,314	24,6	49,8	165	98,8	11,6
	Receptor	7,189	15,8	43,1	195	99,3	14,3
5	Doador	7,56	23,9	26,6	415	99,9	9,6
	Receptor	7,217	18,8	47,9	152	99,2	14,9

pH – Potencial de Hidrogênio, BIC – Íon bicarbonato (mmol/L), PCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico (mmHg), PO₂ – Pressão parcial de oxigênio, SO₂ – Saturação de oxigênio (%)

Tabela C6 - Gasometria arterial no grupo SHUNT

		pH	BIC	PCO ₂	PO ₂	SO ₂	Hb
1	Doador	7,55	26,4	30,4	213	100	9,5
	Receptor	7,22	16,1	40,9	164	99,6	10,7
2	Doador	7,47	29,2	40,6	254	100	12
	Receptor	7,23	13,4	33,3	195	99,9	10
3	Doador	7,48	33,6	45,8	208	99,8	10,4
	Receptor	7,21	16,1	41,5	156	99,5	13,2

4	Doador	7,45	27,8	40,4	157	100	11,6
	Receptor	7,36	22,9	42	137	99,4	13,1
5	Doador	7,52	30,1	37,2	183	100	11
	Receptor	7,38	28,1	48,5	116	98,8	14,9
6	Doador	7,34	19,5	37,3	168	99,8	10,2
	Receptor	7,13	16,5	51,7	111	96,8	13,8

pH – Potencial de Hidrogênio, BIC – Íon bicarbonato (mmol/L), PCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico (mmHg), PO₂ – Pressão parcial de oxigênio, SO₂ – Saturação de oxigênio (%)

Tabela C7 - Gasometria portal no grupo controle (CTRL)

		pH	BIC	PCO ₂	PO ₂	SO ₂	Hb
1	Doador	7,396	28,4	47,2	54	77,2	10,4
	Receptor	7,151	25,3	75,5	47,2	57,5	13,3
2	Doador	7,349	27,1	50,5	58,8	82	9,1
	Receptor	7,154	17,7	52,6	50,7	60,5	10,2
3	Doador	7,428	23,2	35,7	48,1	73,1	9,5
	Receptor	7,315	24,5	49,5	51,5	68,8	13,1
4	Doador	7,361	27,8	50,4	40,3	57,1	9,8
	Receptor	7,129	17	53,7	49,1	56,3	13,3
5	Doador	7,34	28	53,2	44,2	61,6	9,5
	Receptor	7,294	20,3	43,1	49,1	67,6	11,7

pH – Potencial de Hidrogênio, BIC – Íon bicarbonato (mmol/L), PCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico (mmHg), PO₂ – Pressão parcial de oxigênio, SO₂ – Saturação de oxigênio (%)

Tabela C8 - Gasometria portal no grupo *Large-for-Size* (LFS)

		pH	BIC	PCO ₂	PO ₂	SO ₂	Hb
1	Doador	7,351	29,9	55,5	69,4	88,9	12,5
	Receptor	7,097	22,3	75,7	49,8	55,1	13,9
2	Doador	7,38	30	51,8	44,1	67,3	10,2
	Receptor	7,107	22	73	46,3	52	13
3	Doador	7,321	28,3	56,5	48	74,9	11,7
	Receptor	7,001	18,9	80,6	56,6	59,9	14,8
4	Doador	7,242	25,9	62,4	55,8	74	11,2
	Receptor	7,104	18,4	61,4	50,4	61,8	14,8
5	Doador	7,454	26,6	38,4	44	69,2	11,2
	Receptor	7,109	21,9	72,2	45,1	64	15,7

pH – Potencial de Hidrogênio, BIC – Íon bicarbonato (mmol/L), PCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico (mmHg), PO₂ – Pressão parcial de oxigênio, SO₂ – Saturação de oxigênio (%)

Tabela C9 - Gasometria portal no grupo SHUNT

		pH	BIC	PCO ₂	PO ₂	SO ₂	Hb
1	Doador	7,45	29	42,6	40,1	59,7	9,5
	Receptor	7,11	20,7	67,5	37,4	34	12,1

2	Doador	7,41	30,6	48,8	47	67,5	10,4
	Receptor	7,16	15,6	45	56,1	67,4	11,6
3	Doador	7,44	31,3	46,8	57,9	83,6	9
	Receptor	7,14	18,5	57,2	58,4	70,1	13,2
4	Doador	7,42	30,4	48,1	48,3	73,6	11,1
	Receptor	7,28	25	55	49,8	68,3	13,1
5	Doador	7,39	33,7	56,7	36,2	53,7	10,8
	Receptor	7,31	31,9	65,2	31,3	35,1	15,3
6	Doador	7,32	23	45,3	53,9	79,8	9,6
	Receptor	7,1	21,1	70,3	44,6	45,7	13,7

pH – Potencial de Hidrogênio, BIC – Íon bicarbonato (mmol/L), PCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico (mmHg), PO₂ – Pressão parcial de oxigênio, SO₂ – Saturação de oxigênio (%)

Tabela C10 - Gasometria hepática no grupo controle (CTRL)

		pH	BIC	PCO ₂	PO ₂	SO ₂	Hb
1	Doador	7,407	27,3	44,2	38,8	54,2	10,2
	Receptor	7,173	26,5	75,1	29,9	26,6	13,7
2	Doador	7,361	27	49	49,1	72,7	9
	Receptor	7,176	18,3	51,7	44,9	52,8	10
3	Doador	7,5	23,1	29,8	46,6	75,1	9,2
	Receptor	7,321	23,2	46,2	37,8	44,9	12,2
4	Doador	7,409	28	45	31,3	42	9,8
	Receptor	7,154	18,6	55	33,7	30,4	13,3
5	Doador	7,371	28,4	50,1	39,8	55,3	9,2
	Receptor	7,284	21,1	46	33,9	38,4	11,7

pH – Potencial de Hidrogênio, BIC – Íon bicarbonato (mmol/L), PCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico (mmHg), PO₂ – Pressão parcial de oxigênio, SO₂ – Saturação de oxigênio (%)

Tabela C11 - Gasometria hepática no grupo *Large-for-Size* (LFS)

		pH	BIC	PCO ₂	PO ₂	SO ₂	Hb
1	Doador	7,343	29,8	56,4	49,3	71,7	12
	Receptor	7,099	23	77,6	28,9	19,2	13,5
2	Doador	7,23	27,8	68,7	33,6	37	11,4
	Receptor	7,042	22,4	86,5	27,8	17,9	12,1
3	Doador	7,355	27,6	50,6	51,3	68,7	11,5
	Receptor	6,991	19,9	86,7	43,2	36,3	14,7
4	Doador	7,257	25,7	59,7	49,1	66,9	10,9
	Receptor	7,099	20,3	68,6	37	33,5	14,2
5	Doador	7,474	27	37,2	34,5	52,1	11,9
	Receptor	7,037	23,9	93,5	15,1	48,5	15,2

pH – Potencial de Hidrogênio, BIC – Íon bicarbonato (mmol/L), PCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico (mmHg), PO₂ – Pressão parcial de oxigênio, SO₂ – Saturação de oxigênio (%)

Tabela C12 - Gasometria hepática no grupo SHUNT

		pH	BIC	PCO ₂	PO ₂	SO ₂	Hb
1	Doador	7,49	29,4	38,7	33,4	48,1	9,5
	Receptor	7,1	21,6	72,8	24,2	12,1	11,8
2	Doador	7,44	27,7	41	46,6	69,3	9,1
	Receptor	7,18	16,8	47	30,3	24,5	10,9
3	Doador	7,45	34,4	50,5	40,6	62,2	8,9
	Receptor	7,15	19,3	57,3	43,8	47,9	13
4	Doador	7,43	29,1	44,5	46,8	73,2	11,3
	Receptor	7,29	22	46,9	38,4	48,5	12
5	Doador	7,47	32,1	44,6	48,9	66	11
	Receptor	7,3	33,7	70,7	19,1	11,5	14,8
6	Doador	7,31	22	45	53,5	63	10,6
	Receptor	7,07	22,1	78,7	38,2	34,7	14,7

pH – Potencial de Hidrogênio, BIC – Íon bicarbonato (mmol/L), PCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico (mmHg), PO₂ – Pressão parcial de oxigênio, SO₂ – Saturação de oxigênio (%)

Tabela C13- Peso (g) total e do enxerto dos animais no grupo controle (CTRL)

		Peso total	Peso enxerto	GBWR
1	Doador	30500	990	
	Receptor	30200	990	3,28
2	Doador	17500	610	
	Receptor	17000	610	3,59
3	Doador	19500	650	
	Receptor	21500	650	3,02
4	Doador	18200	680	
	Receptor	19200	680	3,54
5	Doador	18200	690	
	Receptor	20000	690	3,45

GBWR – *graft to body weight ratio*

Tabela C14 - Peso (g) total e do enxerto dos animais no grupo *Large-for-Size* (LFS)

		Peso total	Peso enxerto	GBWR
1	Doador	88000	1960	
	Receptor	38000	1960	5,16
2	Doador	41500	1195	
	Receptor	29500	1195	4,05
3	Doador	41500	1010	
	Receptor	22000	1010	4,59
4	Doador	43000	1435	
	Receptor	20000	1435	7,18
5	Doador	33000	875	
	Receptor	17300	875	5,06

GBWR – *graft to body weight ratio*

Tabela C15 - Peso (g) total e do enxerto dos animais no grupo SHUNT

		Peso total	Peso enxerto	GBWR
1	Doador	39200	1190	4,1
	Receptor	29000	765	
2	Doador	40000	945	4,85
	Receptor	19500	640	
3	Doador	39000	1125	6,28
	Receptor	17900	520	
4	Doador	60600	1605	6,32
	Receptor	25400	815	
5	Doador	45000	1265	6,02
	Receptor	21000	875	
6	Doador	47000	1180	6,05
	Receptor	19500	535	

GBWR – *graft to body weight ratio*

Tabela C16 - Dosagem sérica das enzimas hepáticas (ALT e AST) no grupo controle (CTRL)

		ALT	AST
1	Doador	58	78
	Receptor	89	760
2	Doador	62	51
	Receptor	40	121
3	Doador	23	62
	Receptor	46	629
4	Doador	58	49
	Receptor	105	653
5	Doador	57	46
	Receptor	54	406

ALT - alanina aminotransferase, AST – aspartato aminotransferase

Tabela C17 - Dosagem sérica das enzimas hepáticas (ALT e AST) no grupo *Large-for-Size* (LFS)

		ALT	AST
1	Doador	25	50
	Receptor	120	1496
2	Doador	51	97
	Receptor	83	1006
3	Doador	43	55
	Receptor	77	1150
4	Doador	35	89

	Receptor	55	710
5	Doador	45	50
	Receptor	66	830

ALT - alanina aminotransferase, AST – aspartato aminotransferase

Tabela C18 - Dosagem sérica das enzimas hepáticas (ALT e AST) no grupo SHUNT

		ALT	AST
1	Doador	59	52
	Receptor	139	1600
2	Doador	33	41
	Receptor	34	443
3	Doador	318	90
	Receptor	150	667
4	Doador	62	28
	Receptor	133	2051
5	Doador	43	51
	Receptor	83	856
6	Doador	31	24
	Receptor	64	514

ALT - alanina aminotransferase, AST – aspartato aminotransferase

Anexo D – Gráficos das curvas de eficiência e *melting* dos genes IL-6 e β -actina

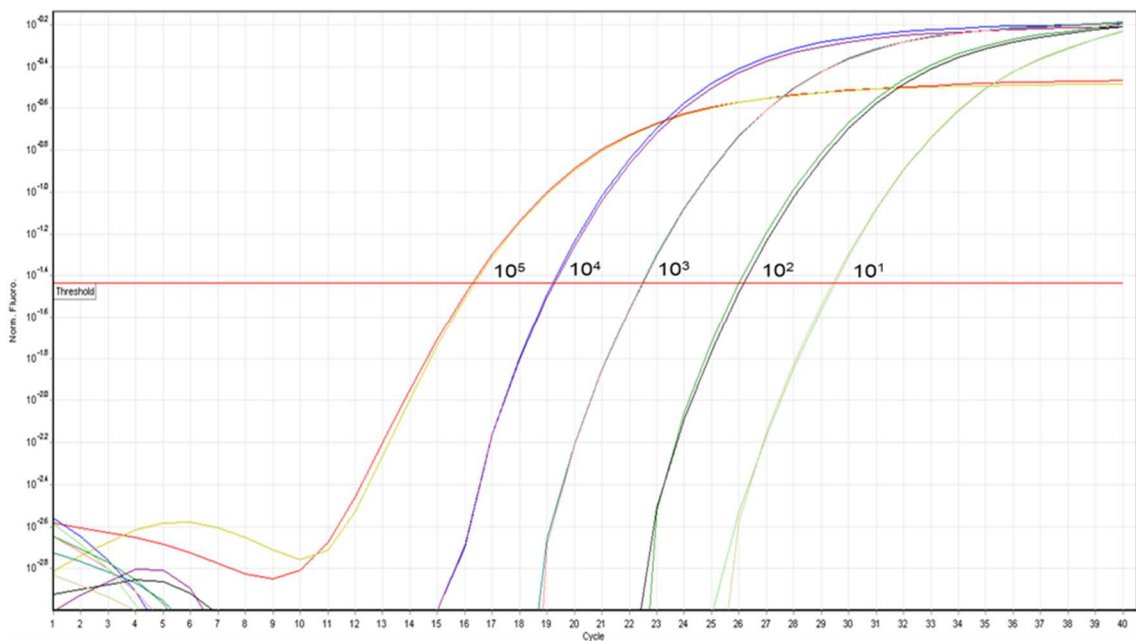


Gráfico D1 – Curva de eficiência do gene β -actina

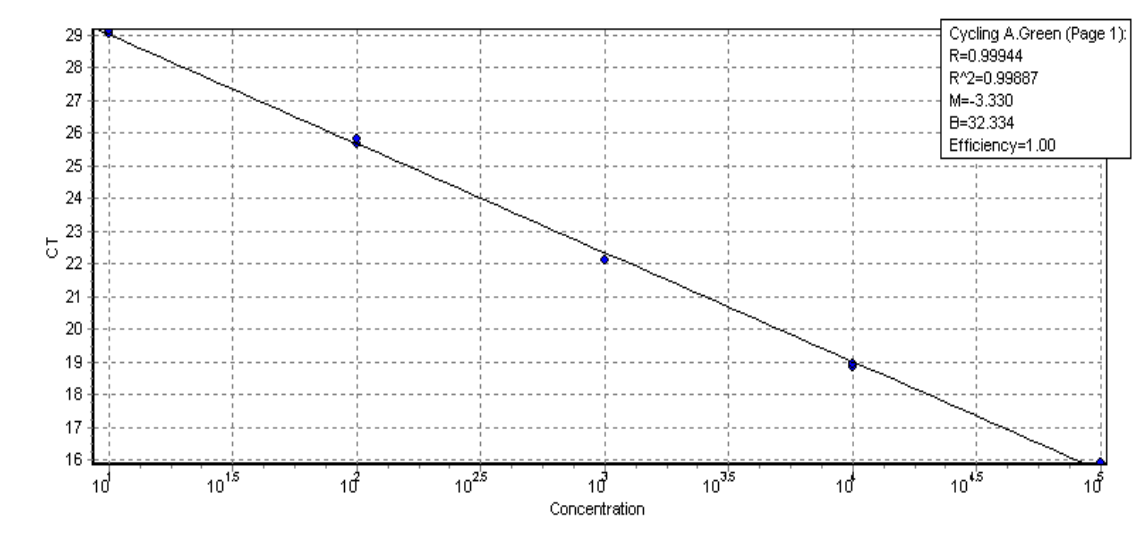


Gráfico D2 – Eficiência do gene β -actina

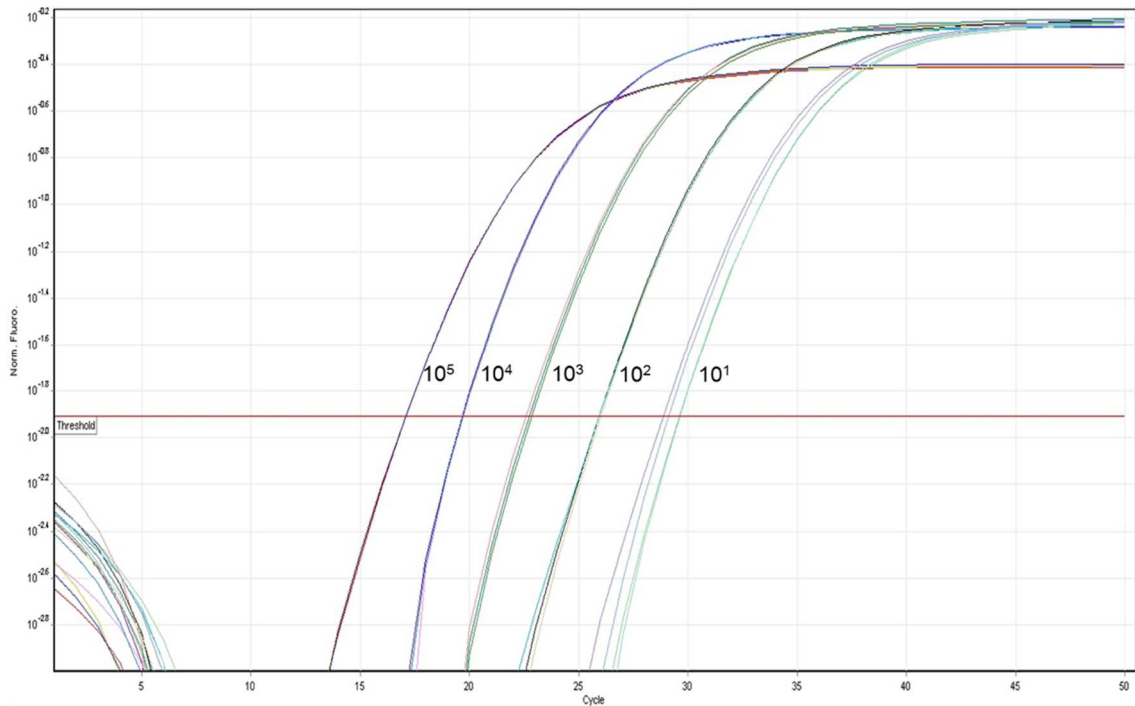


Gráfico D3 – Curva de eficiência do gene IL-6

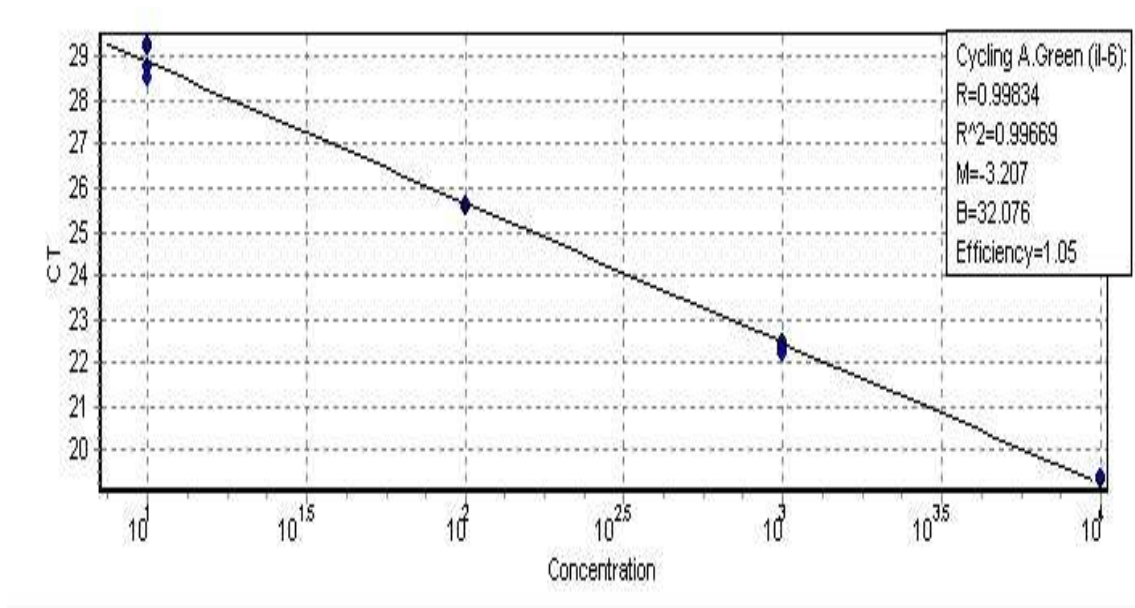


Gráfico D4 – Curva de eficiência do gene IL-6

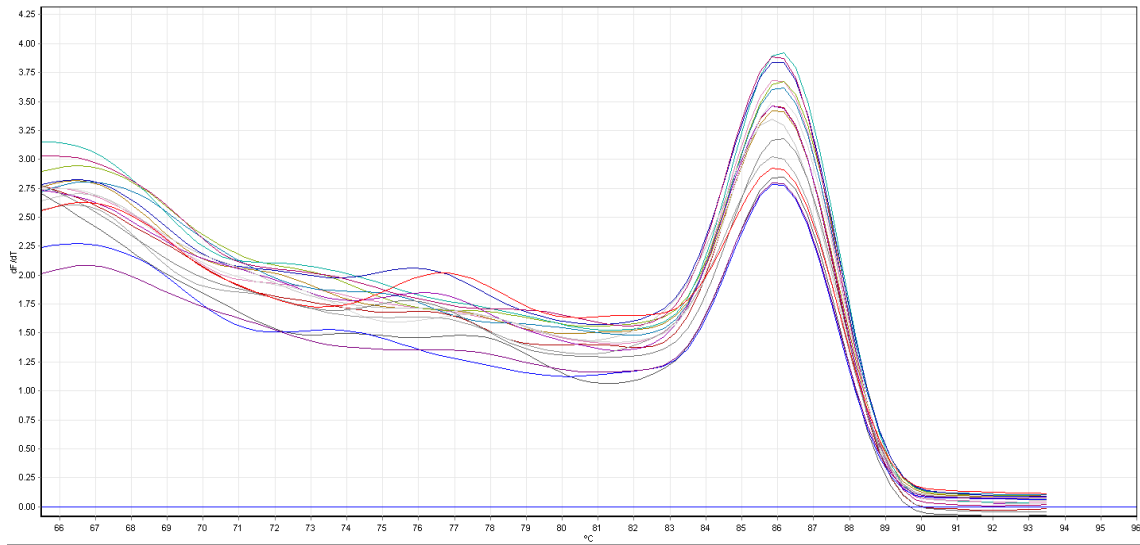


Gráfico D5 – Curva de dissociação ou *melting* do gene β -actina

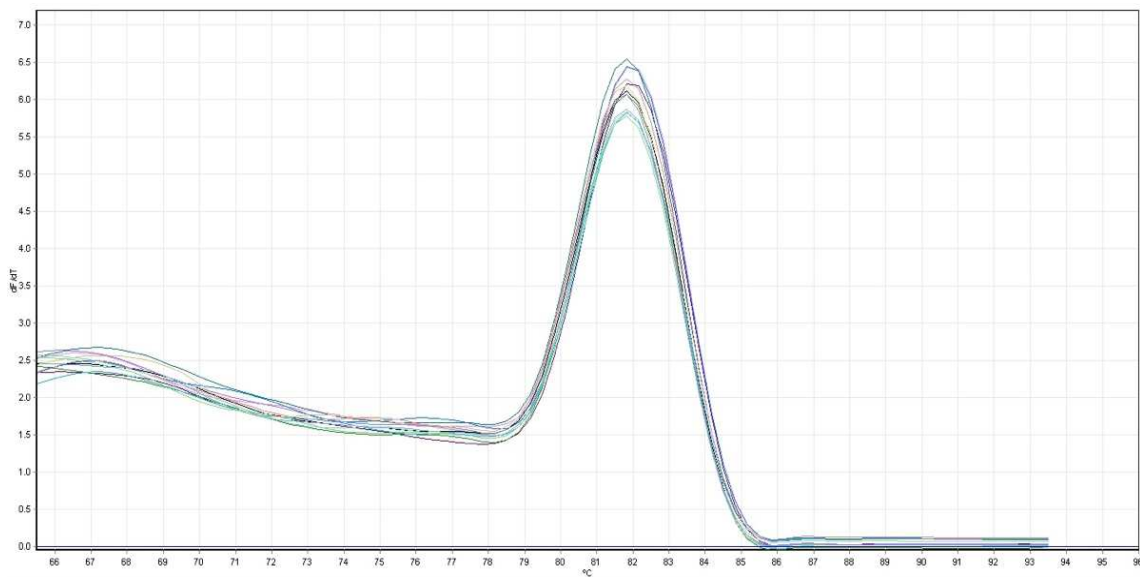


Gráfico D6 – Curva de dissociação ou *melting* do gene IL-6

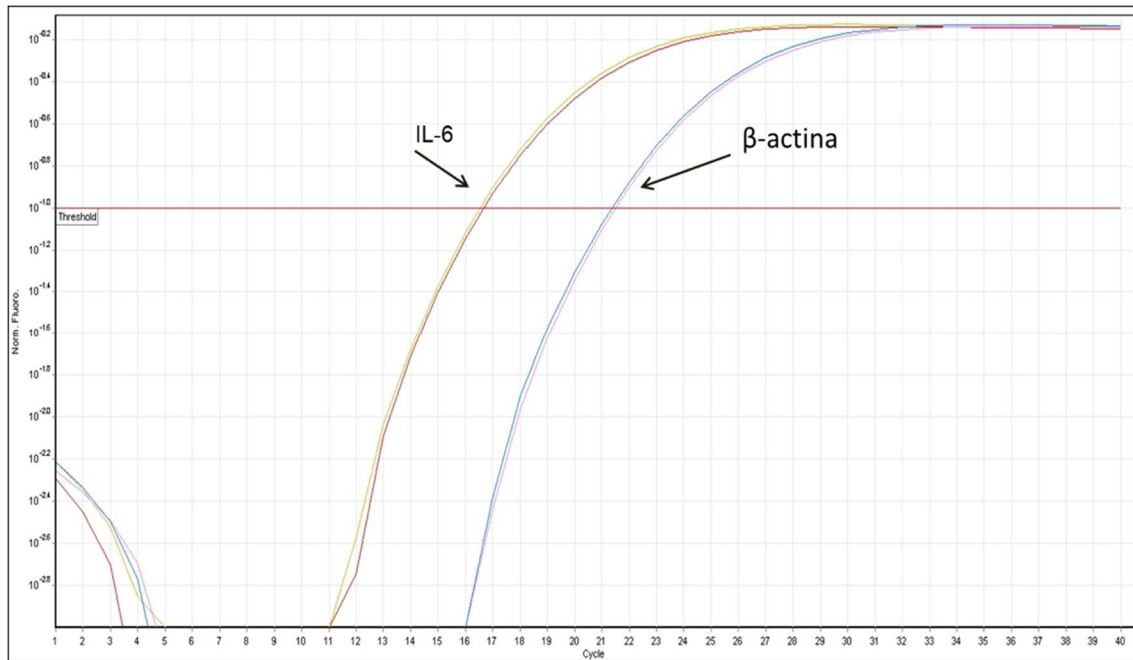


Gráfico D7 – Curva de amplificação de RT-PCR Real Time da IL-6 e β -actina

8 – Referências

-
1. Kim WR, Lake JR, Smith JM, Skeans MA, Schladt DP, Edwards EB, et al. OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: Liver. *Am J Transplant.* 2015;15 Suppl 2:1-28.
 2. Emre S, Umman V, Cimsit B, Rosencrantz R. Current concepts in pediatric liver transplantation. *The Mount Sinai journal of medicine, New York.* 2012;79(2):199-213.
 3. Spada M. Pediatric liver transplantation. *World Journal of Gastroenterology.* 2009;15(6):648.
 4. Bismuth H, Houssin D. Reduced-sized orthotopic liver graft in hepatic transplantation in children. *Surgery.* 1984;95(3):367-70.
 5. Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from live donors. *Lancet.* 1989;2(8661):497.
 6. Lauth WW. Regulatory processes interacting to maintain hepatic blood flow constancy: Vascular compliance, hepatic arterial buffer response, hepatorenal reflex, liver regeneration, escape from vasoconstriction. *Hepatol Res.* 2007;37(11):891-903.
 7. Wakim KG. Physiology of the liver. *Am J Med.* 1954;16(2):256-71.
 8. 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(2):321-7.
-

-
9. Kasahara M, Sakamoto S, Umeshita K, Inomata Y, Uemoto S. Outcomes of Pediatric Living Donor Liver Transplantation in Japan: An Analysis of More Than 2,200 Cases in the Registry of the Japanese Liver Transplantation Society. *Liver Transplantation*. 2013;19:S111-S.
 10. Kasahara M, Fukuda A, Yokoyama S, Sato S, Tanaka H, Kuroda T, et al. Living donor liver transplantation with hyperreduced left lateral segments. *J Pediatr Surg*. 2008;43(8):1575-8.
 11. 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(2):321-7.
 12. 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(6):1201-10.
 13. Troisi R, de Hemptinne B. Clinical relevance of adapting portal vein flow in living donor liver transplantation in adult patients. *Liver Transpl*. 2003;9(9):S36-41.
 14. 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. *International journal of surgery*. 2014;12(2):177-80.
-

-
15. Kelly DM, Shiba H, Nakagawa S, Irefin S, Eghtesad B, Quintini C, et al. Hepatic blood flow plays an important role in ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl.* 2011;17(12):1448-56.

 16. Pan N, Lv X, Liang R, Wang L, Liu Q. Suppression of graft regeneration, not ischemia/reperfusion injury, is the primary cause of small-for-size syndrome after partial liver transplantation in mice. *PLoS One.* 2014;9(4):e93636.

 17. 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(3):364-74.

 18. Feng AC, Fan HL, Chen TW, Hsieh CB. Hepatic hemodynamic changes during liver transplantation: a review. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2014;20(32):11131-41.

 19. Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos. Registro Brasileiro de Transplantes jan/dez 2013 Brasil: ABTO; 2013 [Acessado em 22/10/2014]. ANO XiX Nº4:[Disponível em: [http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2013/rbt2013-parcial\(1\).pdf](http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2013/rbt2013-parcial(1).pdf)].

 20. Chung PH, Chan SC, Mok VW, Tam PK, Lo CM. Recipient body size does not matter in pediatric liver transplantation. *J Pediatr Surg.* 2014;49(12):1734-7.

 21. Schulze M, Dresske B, Deinzer J, Braun F, Kohl M, Schulz-Juergensen S, et al. Implications for the usage of the left lateral liver graft for infants <= 10 kg, irrespective
-

of a large-for-size situation - are monosegmental grafts redundant? *Transplant International*. 2011;24(8):797-804.

22. Leal AJG, Tannuri ACA, Belon AR, Guimarães RRN, Coelho MCM, de Oliveira Gonçalves J, et al. A simplified experimental model of large-for-size liver transplantation in pigs. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(8):1152-6.

23. Leal AJ, Tannuri AC, Belon AR, Guimaraes RR, Coelho MC, Goncalves JO, et al. Effects of ischemic preconditioning in a pig model of large-for-size liver transplantation. *Clinics*. 2015;70(2):126-35.

24. Troisi R, Cammu G, Militerno G, De Baerdemaeker L, Decruyenaere J, Hoste E, et al. Modulation of portal graft inflow: A necessity in adult living-donor liver transplantation? *Ann Surg*. 2003;237(3):429-36.

25. Uhlmann D, Uhlmann S, Spiegel HU. Endothelin/nitric oxide balance influences hepatic ischemia-reperfusion injury. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2000;36(5 Suppl 1):S212-4.

26. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S31-44.

27. Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2004;8(4):445-54.

-
28. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology*. 2001;33(2):397-405.
29. Wieland E, Oellerich M, Braun F, Schutz E. c-fos and c-jun mRNA expression in a pig liver model of ischemia/reperfusion: Effect of extended cold storage and the antioxidant idebenone. *Clin Biochem*. 2000;33(4):285-90.
30. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, et al. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J*. 1999;13(2):253-61.
31. Nakajima H, Mizuta N, Fujiwara I, Sakaguchi K, Ogata H, Magae J, et al. Blockade of the Fas/Fas ligand interaction suppresses hepatocyte apoptosis in ischemia-reperfusion rat liver. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2008;13(8):1013-21.
32. Rüdiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor α , but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology*. 2002;122(1):202-10.
33. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*. 2008;147(1):153-9.
-

-
34. Klune JR, Tsung A. Molecular biology of liver ischemia/reperfusion injury: established mechanisms and recent advancements. *Surg Clin North Am.* 2010;90(4):665-77.
35. Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Journal of leukocyte biology.* 1995;57(3):368-74.
36. Guan LY, Fu PY, Li PD, Li ZN, Liu HY, Xin MG, et al. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *World journal of gastrointestinal surgery.* 2014;6(7):122-8.
37. Theruvath TP, Zhong Z, Currin RT, Ramshesh VK, Lemasters JJ. Endothelial nitric oxide synthase protects transplanted mouse livers against storage/reperfusion injury: Role of vasodilatory and innate immunity pathways. *Transplant Proc.* 2006;38(10):3351-7.
38. Fondevila C, Hessheimer AJ, Flores E, Vendrell M, Muñoz J, Escobar B, et al. Step-by-step guide for a simplified model of porcine orthotopic liver transplant. *J Surg Res.* 2011;167(1):e39-45.
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
-

-
40. Kanazawa H, Sakamoto S, Fukuda A, Shigeta T, Loh DL, Kakiuchi T, et al. Portal vein reconstruction in pediatric living donor liver transplantation for patients younger than 1 year with biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery*. 2012;47(3):523-7.
41. Kasahara M, Uryuhara K, Kaihara S, Kozaki K, Fujimoto Y, Ogura Y, et al. Monosegmental living donor liver transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2003;35(4):1425-6.
42. Kanazawa H, Sakamoto S, Fukuda A, Uchida H, Hamano I, Shigeta T, et al. Living-Donor Liver Transplantation With Hyperreduced Left Lateral Segment Grafts: A Single-Center Experience. *Transplantation*. 2013;95(5):750-4.
43. Ogawa K, Kasahara M, Sakamoto S, Ito T, Taira K, Oike F, et al. Living donor liver transplantation with reduced monosegments for neonates and small infants. *Transplantation*. 2007;83(10):1337-40.
44. Urahashi T, Mizuta K, Sanada Y, Wakiya T, Yasuda Y, Kawarasaki H. Liver graft volumetric changes after living donor liver transplantation with segment 2 graft for small infants. *Pediatric Transplantation*. 2012;16(7):783-7.
45. Kasahara M, Kaihara S, Oike F, Ito T, Fujimoto Y, Ogura Y, et al. Living-donor liver transplantation with monosegments. *Transplantation*. 2003;76(4):694-6.
46. Enne M, Pacheco-Moreira LF, Cerqueira A, Balbi E, Halpern M, Pereira JL, et al. Liver transplantation with monosegment from a living donor. *Pediatric Transplantation*. 2004;8(2):189-91.
-

-
47. Shibasaki S, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, Yamashita K, Ohta M, et al. Perioperative Risk Factors for Portal Vein Complications in Pediatric Living Donor Liver Transplantation. *Liver Transplantation*. 2008;14(7):S156-S7.
48. Shibasaki S, Taniguchi M, Shimamura T, Suzuki T, Yamashita K, Wakayama K, et al. Risk factors for portal vein complications in pediatric living donor liver transplantation. *Clinical Transplantation*. 2010;24(4):550-6.
49. Shigeta T, Kasahara M, Sakamoto S, Fukuda A, Kakiuchi T, Nakazawa A, et al. Analysis of Prognostic Factors in Pediatric Living Donor Liver Transplantation for Biliary Atresia. *Pediatric Transplantation*. 2011;15:123-.
50. Sakamoto S, Nosaka S, Fukuda A, Shigeta T, Kakiuchi T, Miyazaki O, et al. Portal Vein Obstruction after Pediatric Living Donor Liver Transplantation. *Pediatric Transplantation*. 2011;15:122-.
51. Eipel C. Regulation of hepatic blood flow: The hepatic arterial buffer response revisited. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(48):6046.
52. Pratschke S, Meimarakis G, Bruns CJ, Kaspar M, Prix N, Zachoval R, et al. Temporary intraoperative porto-caval shunt: useless or beneficial in piggy back liver transplantation? *Transpl Int*. 2013;26(1):90-8.
53. Fukazawa K, Nishida S, Volsky A, Tzakis AG, Pretto EA, Jr. Body surface area index predicts outcome in orthotopic liver transplantation. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 2011;18(2):216-25.
-

-
54. Fukazawa K, Yamada Y, Nishida S, Hibi T, Arheart KL, Pretto EA. Determination of the safe range of graft size mismatch using body surface area index in deceased liver transplantation. *Transpl Int.* 2013;26(7):724-33.
55. Arnon R, Annunziato R, Miloh T, Sogawa H, Nostrand KV, Florman S, et al. Liver transplantation in children weighing 5 kg or less: analysis of the UNOS database. *Pediatr Transplant.* 2011;15(6):650-8.
56. Kasahara M, Kaihara S, Oike F, Ito T, Fujimoto Y, Ogura Y, et al. Living-donor liver transplantation with monosegments. *Transplantation.* 2003;76(4):694-6.
57. Heuer M, Reinhardt R, Kneiseler G, Wurzinger P, Zou X, Hua F, et al. Liver Transplantation in Swine without Venovenous Bypass. *European Surgical Research.* 2010;45(1):20-5.
58. Briceno J, Ciria R. Early graft dysfunction after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2010;42(2):631-3.
59. Camargo CA, Madden JF, Gao WS, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology.* 1997;26(6):1513-20.
-