Antônio José Gonçalves e Leal

**Modelo de transplante hepático *large-for-size* em suínos:
estudos bioquímicos, histológicos, moleculares e efeito do
pré-condicionamento isquêmico**

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

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Leal, Antônio José Gonçalves e

Modelo de transplante hepático *large-for-size* em suínos : estudos
bioquímicos, histológicos, moleculares e efeito do pré-condicionamento
isquêmico / Antônio José Gonçalves e Leal. -- São Paulo, 2013.

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. Transplante de fígado/métodos
3. Modelos animais 4. Isquemia 5. Reperfusão 6. Apoptose
7. Precondicionamento isquêmico 8. Regeneração hepática 9. Suínos/cirurgia

USP/FM/DBD-153/13

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 30/03/2011, sob número 027/11.

Os recursos financeiros foram obtidos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do projeto número 2011/12550-0 – São Paulo, Brasil.

Ao meu pai, José, pelo amor e por me ensinar a sonhar.

À minha mãe, Marisa, pelo amor, sua atuação ética e profissional são exemplos para mim.

À Jamile, pelo amor, pelo apoio incondicional e por estar sempre ao meu lado.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri, minha orientadora, pelo estímulo contínuo e pelas preciosas orientações. Sua presença constante nos procedimentos cirúrgicos tornou possível a elaboração desta tese.

Ao Prof. Dr. Uenis Tannuri, pelo incentivo e pelas importantes sugestões para execução desta tese. Seu espírito pesquisador e sua seriedade na atuação profissional são merecedores de meu profundo respeito, admiração e gratidão.

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

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

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

Ao Dr. Evandro Sobroza de Melo, pelas orientações e atenção na avaliação histológica.

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

À Dra. Maria Mercês Santos, pelo convívio, pelos ensinamentos e pelo incentivo constante.

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

À Sra. Eliane Falconi Monico Gazetto, pelo seu auxílio durante o andamento dessa tese.

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.

Aos amigos da residência de Cirurgia Pediátrica, Dr. Fábio de Barros, Dr. Luiz Roberto Schlaich Ricardi, Dr. Daniel de Albuquerque Rangel Moreira, Dra. Marina de Assis Galvão Bueno e Dra. Roberta Figueiredo Monteiro, pela compreensão e apoio nos procedimentos.

A todos da Disciplina de Cirurgia Pediátrica e Transplante Hepático, Dr. Arthur Loghetti Mathias, 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, Dra. Maria Lúcia de Pinho-Apezato e Dr. Wagner de Castro Andrade, pelas lições recebidas no convívio e pela grande contribuição em minha formação profissional.

"De todos os presentes da natureza para a raça humana, o
que é mais doce para o homem do que as crianças?"

Marcus Tullius Cicero

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

1. Introdução	1
2. Objetivos	13
3. Métodos.....	15
3.1. Animal de experimentação	16
3.2. Plano Piloto.....	16
3.2.1. Cirurgia do doador	17
3.2.2. Cirurgia da bandeja	20
3.2.3. Cirurgia do receptor	21
3.3. Plano Experimental.....	33
3.3.1. Análise de parâmetros hemodinâmicos	34
3.3.2. Análise de gasometria arterial, sódio e potássio.....	35
3.3.3. Análise das enzimas hepáticas	35
3.3.4. Análise histológica	35
3.3.5. Análise Molecular	36
Extração do ácido ribonucleico (ARN).....	36
Transcrição Reversa.....	37
Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa (qRT-PCR ou RT-PCR)	38
Análise dos resultados da qRT-PCR.....	40
3.3.6. Análise estatística.....	46
4. Resultados.....	47
4.1. Mortalidade dos animais.....	48
4.2. Análise do peso dos animais receptores e doadores e da relação peso do fígado e peso do receptor	48
4.3. Análise dos tempos de isquemia total e quente	51
4.4. Análise de parâmetros hemodinâmicos	53
4.5. Análise de gasometria arterial, sódio e potássio	53
4.6. Análise de enzimas hepáticas	55
4.7. Análise histológica	59
4.8. Análise molecular	64
4.8.1. Expressão do gene Bax (pró-apoptótico)	64
4.8.2. Expressão do gene Bcl-XL (anti-apoptótico).....	66
4.8.3. Expressão do gene eNOS	68
4.8.4. Expressão do gene IL-6.....	70
5. Discussão.....	72
6. Conclusões	84
7. Anexos	86
8. Referências.....	99

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanina aminotransferase
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
AVB	Atresia das vias biliares
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais
CPDA	<i>Citrate Phosphate dextrose adenosine</i>
CT	<i>Threshold Cycle</i>
FC	Frequência cardíaca
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GBWR	<i>Graft-body weight ratio</i>
HE	Hematoxilina-eosina
IL	Interleucina
IR	Isquemia-reperfusão
LFS	<i>Large-for-size</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico-sintase
PAM	Pressão arterial média
PCI	Pré-condicionamento isquêmico
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVC	Cloreto de polivinila
TNF	<i>Tumoral necrosis fator</i>

RESUMO

Leal AJ. *Modelo de transplante hepático large-for-size em suínos: estudos bioquímicos, histológicos, moleculares e efeito do pré-condicionamento isquêmico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: O transplante hepático se consolidou como terapêutica para crianças com doença hepática em estágio terminal. A principal indicação nessa faixa etária é a atresia das vias biliares, doença colestática que leva à cirrose hepática na maioria dos casos nos primeiros anos de vida mesmo nas crianças submetidas a portoenterostomia. Essas crianças evoluem entre outras complicações com desnutrição grave e necessitam do transplante precocemente. A relação ideal do peso do enxerto hepático e o peso do receptor varia de 1 a 3%. No entanto, quando o transplante é realizado em crianças em idade inferior a 2 anos, essa relação na maioria das vezes é maior do que 5%. Essa situação é conhecida como *large-for-size*, em que a perfusão sanguínea do enxerto pode ser insuficiente, o que leva a disfunção do órgão. Os mecanismos de lesão neste cenário ainda não estão bem esclarecidos. A lesão de isquemia-reperfusão (IR) é apontada como um dos fatores para o mal funcionamento do enxerto bem como de outras complicações. Nessa lesão estão envolvidos elementos da cascata inflamatória culminando em morte celular por apoptose bem como mecanismos de regeneração celular. Um fenômeno conhecido que atenua a lesão de IR é o pré-condicionamento isquêmico (PCI). Nenhum trabalho experimental foi realizado com o objetivo de avaliar a lesão hepática na situação *large-for-size* e o efeito do PCI nessa situação. **MÉTODOS:** Para a padronização do modelo foram realizados 8 transplantes, tendo sido testados os pesos dos animais, relação entre o peso do enxerto hepático e peso do receptor e técnica cirúrgica. Na fase experimental, foram realizados 21 transplantes e os animais foram divididos em 3 grupos. No primeiro grupo (controle) o transplante era realizado com doadores e receptores com pesos similares. Para caracterização da situação *large-for-size*, no segundo grupo os doadores tinham aproximadamente o dobro do peso dos receptores (LFS). No terceiro grupo a distribuição de peso foi semelhante a do segundo, porém era realizado o PCI no doador (LFS+PCI). Os procedimentos foram realizados sob anestesia geral e técnica asséptica e os animais foram mantidos vivos por 3 horas após a reperfusão. Foram obtidas amostras de sangue em 3 períodos (logo após abertura da cavidade abdominal, 1 e 3 horas após reperfusão) e fragmentos de fígado 1 e 3 horas após reperfusão. As amostras de sangue foram submetidas a gasometria arterial, dosagem de sódio, potássio e enzimas hepatocelulares. Os fragmentos de tecido hepático foram submetidos a análise histológica pela coloração da hematoxilina-eosina (HE) e a análise de quantificação da expressão dos genes pró-apoptótico (Bax), anti-apoptótico (Bcl-XL), da óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) e da interleucina-6 (IL-6). **RESULTADOS:** A mortalidade observada foi de 28%. A relação peso do enxerto e peso do paciente foi de 2,9% no grupo controle, 6,3% no grupo LFS e 6,4% no grupo LFS+PCI. A natremia 1 hora após a reperfusão foi mais elevada no grupo controle do que nos demais, já com relação ao potássio, a dosagem foi mais baixa nesse grupo no mesmo intervalo. A dosagem da aspartato aminotransferase (AST) foi mais elevada nos grupos LFS e LFS+PCI do que no controle. A análise histológica não

demonstrou diferença entre os grupos. A expressão do gene Bax foi mais elevada no grupo LFS do que nos demais, enquanto que a do gene eNOS foi mais acentuada no grupo LFS+PCI do que nos demais nos dois intervalos estudados. Após 3 horas de reperfusão a expressão do gene IL-6 foi maior no grupo LFS+PCI. CONCLUSÕES: O modelo de transplante hepático *large-for-size* em suínos foi exequível e adequado para a pesquisa. A lesão IR foi mais acentuada no grupo LFS do que no grupo controle e apesar de não ter alterado a elevação de enzimas hepatocelulares, o PCI teve papel de aumentar a expressão dos genes IL-6 e eNOS e diminuir a do gene Bax.

Descritores: 1. Transplante de fígado 2. Transplante de fígado/métodos 3. Modelos animais 4. Isquemia 5. Reperfusão 6. Apoptose 7. Precondicionamento isquêmico 8. Regeneração hepática 9. Suínos/cirurgia

SUMMARY

Leal AJ. *Model of large-for-size porcine liver transplantation: biochemical, histological and molecular studies, and evaluation of the effects of ischemic preconditioning* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUCTION: Liver transplantation has been established as therapy for children with end-stage liver disease. The main indication is biliary atresia, cholestatic disease that leads to cirrhosis in most cases even in children undergoing portoenterostomy. These children develop other complications as severely malnutrition and need early transplantation. The ideal graft to body weight ratio (GBWR) for transplantation varies from 1 to 3%. However, when transplantation is performed in children younger than 2 years, this ratio in most cases is higher than 5%. This situation, known as large-for-size, may be related to insufficient graft perfusion and liver disfunction. The mechanisms of injury involved in this scenario are not well established. Ischemia-reperfusion injury (IRI) has been related as a factor for poor graft function and other complications. Inflammatory cascade culminating in cell death by apoptosis and cellular mechanisms of regeneration are the elements involved in IRI. Ischemic preconditioning (IPC) is a phenomenon that attenuates IR injury. There are no experimental studies conducted to evaluate the hepatic injury in large-for-size situation and the effect of IPC in this situation. **METHODS:** 8 procedures were required for standardize the model. Weight of the animals, GBWR and surgical technique were evaluated. In the experimental phase, 21 transplantations were performed. The animals were divided in three groups. In the first group (control), liver transplantation was performed with donors and recipients with similar weights. To characterize large-for-size situation, donors of the second group had approximately twice the weight receptor (LFS). In the third group the weight distribution was similar to the second but IPC was performed in donor (LFS+IPC). Procedures were performed under general anesthesia and aseptic technique and the animals were kept alive for 3 hours after reperfusion. Blood samples were obtained at three times (immediately after opening the abdominal cavity, 1 and 3 hours after reperfusion) and fragments of liver 1 and 3 hours after reperfusion. Blood samples were analyzed for arterial blood gases, sodium, potassium and hepatocellular enzymes. The fragments of liver tissues were subjected to histological analysis by hematoxylin-eosin staining (HE). Molecular biology involved quantification of the expression of Bax, Bcl-XL, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and interleukin-6 (IL-6) genes. **RESULTS:** The mortality rate was 28%. The GBWR was 2.9% in the control group, 6.3% in the LFS group and 6.4% in the LFS+IPC group. The natremia 1 hour after reperfusion was higher in the control group and potassium dosage was lower in this group in the same period. The dosage of aspartate aminotransferase (AST) was higher in LFS and LFS+IPC groups than control. Histological analysis showed no difference between groups. The Bax gene expression was higher in the LFS, while the eNOS gene was more expressed in LFS + IPC group. After 3 hours of reperfusion the expression of IL-6 gene was higher in the IPC + LFS. **CONCLUSIONS:** The model of large-for-size liver transplantation in swine was feasible and appropriate for the research. IR injury was more pronounced in the

group LFS than in the control group and despite not having changed the elevation of hepatocellular enzymes, the PCI was responsible for increasing the expression of IL-6 and eNOS and decreasing the Bax gene expression.

Descriptors: 1.Liver transplantation 2. Liver transplantation/methods 3. Models, animal 4. Ischemia 5. Reperfusion 6.Apoptosis 7.Ischemic preconditioning 8.Liver regeneration 9.Swine/surgery

1. Introdução

Nas últimas décadas, o transplante de fígado se consolidou como o tratamento definitivo para grande parte das doenças hepáticas terminais da criança¹. Dentre suas indicações, destacam-se a atresia das vias biliares, a hepatite fulminante, as ductopenias sindromáticas e não-sindromáticas e a deficiência de alfa-1-antitripsina².

A atresia das vias biliares (AVB) perfaz cerca de 60% das indicações de transplante na criança na maioria dos grandes centros. Caracteriza-se por um processo progressivo de inflamação e esclerose que leva à completa obliteração dos ductos biliares resultando em cirrose biliar.

A causa e patogênese da AVB permanecem desconhecidas. Estudos relacionados à contribuição da raça, gênero, fatores ambientais, imunológicos e agentes virais foram inconclusivos.

Na tentativa de restabelecer o fluxo biliar e retardar a evolução da cirrose, nos casos de diagnóstico precoce (anterior a 16 semanas de vida) realiza-se a portoenterostomia a Kasai. Apesar da cirurgia, entre 70 a 80% dos pacientes irão necessitar do transplante devido a progressão da fibrose hepática, sendo que pelo menos 50% nos primeiros dois anos de vida³. Aproximadamente 25% dos pacientes operados tornam-se anictéricos. Embora essas crianças tenham uma evolução mais favorável, observa-se em longo prazo que há uma lenta e progressiva lesão hepática e desenvolvimento de hipertensão portal, com piora tardia da função hepática, muitas vezes na adolescência ou na vida adulta quando irão necessitar do transplante.

No entanto, em um grande número de crianças o diagnóstico de atresia de vias biliares é feito tardiamente, acima de 4 meses de idade. Nesta fase, a cirrose já está estabelecida, evoluindo para óbito em poucos meses. Desta forma, as crianças

portadoras de atresia das vias biliares não operadas ou submetidas à cirurgia de Kasai sem melhora da acolia e icterícia necessitam de transplante hepático ainda nos primeiros anos de vida.

Classicamente, as crianças portadoras de doenças crônicas apresentam dificuldade de ganho pondero-estatural. Em especial, a colestase ocasionada pela AVB dificulta a absorção de lipídeos, importante fonte calórica do leite, elemento essencial se não exclusivo da dieta até os 6 meses de idade. Além disso, a ascite que muitas destas crianças desenvolvem na fase de cirrose mais grave é responsável pela diminuição da aceitação alimentar. Desta forma, uma grande parte das crianças portadoras de atresia de vias biliares apresenta quadros de desnutrição intensa⁴.

Tentativas de melhorar o estado nutricional destas crianças com instalação de sonda nasogástrica e introdução de dietas hipercalóricas via de regra não conseguem promover síntese protéica e ganho pondero-estatural, além de por vezes causar anasarca e deflagrar quadros de encefalopatia.

Desta forma, conhecendo-se bem a evolução da doença, a indicação do transplante tem sido cada vez mais precoce, havendo na literatura descrição de casuísticas com número crescente de crianças com menos de 5 kg⁵⁻⁷.

O transplante hepático intervivos, modalidade em que um doador vivo doa parte do fígado para um receptor, foi descrito pela primeira vez em 1989⁸ e atualmente é uma opção largamente utilizada em transplante hepático em crianças⁹. Nos transplantes realizados entre um doador adulto e um receptor pediátrico, o enxerto é constituído, geralmente, pelo lobo esquerdo ou segmento lateral esquerdo (segmentos hepáticos II e III). No entanto, existe uma grande variação individual no tamanho dos segmentos hepáticos, mesmo quando se compara indivíduos saudáveis

candidatos a doadores vivos. Kiuchi *et al.* descreveram que em enxertos provenientes desses doadores que a massa do lobo esquerdo variou de 240 a 525 gramas e do segmento lateral esquerdo de 160 a 405 gramas¹⁰.

A escolha do enxerto é baseada na relação entre a massa do enxerto e o peso do receptor (*graft to body weight ratio* – GBWR). A massa do enxerto considerada adequada encontra-se em torno de 1 a 3% da massa corpórea do receptor. Em geral, o lobo esquerdo é usado para receptores com peso em torno de 20 a 40 kg, e o segmento lateral esquerdo para pacientes menores.

Com a escassez de doadores que ocorre em nosso meio, cada vez mais nos deparamos com a necessidade de realização de um transplante entre um doador de 80 a 90 kg para uma criança de 4 a 6 kg, tanto em transplantes intervivos quanto em provenientes de doadores cadáveres. Nessa situação, frequentemente a relação entre o peso do enxerto e o peso do paciente ultrapassa 5%, essa desproporção é conhecida como *large-for-size*, ou seja, um enxerto grande para um receptor pequeno.

No entanto, as consequências dessa desproporção ainda não são bem conhecidas, isto é, os eventuais mecanismos de lesão hepatocelular dessa situação ainda não estão esclarecidos na literatura presente. A perfusão sanguínea do enxerto pode ser insuficiente, o que pode levar a disfunção do órgão¹⁰. A hipoplasia da veia porta é um achado comumente visto em pacientes com AVB submetidos ao transplante hepático, podendo ser um fator que contribua com a má perfusão do enxerto, levando a disfunção do mesmo.

Além disso, o volume ocupado por um enxerto desproporcionalmente grande gera dificuldades no fechamento da cavidade abdominal, acarretando síndrome compartimental abdominal.

De forma inversa, há a situação de um enxerto desproporcionalmente pequeno para o receptor, chamada de *small-for-size syndrome*. Tal situação é mais freqüente em transplantes intervivos entre dois adultos^{11,12}, e se caracteriza por disfunção do enxerto, desta vez relacionada ao hiperfluxo portal^{12,13}.

Mais recentemente, tem sido proposta a realização de transplantes monossegmentares em pacientes pequenos com o objetivo de evitar a situação *large-for-size*¹⁴⁻¹⁶. Essa técnica é realizada em alguns centros para crianças menores de 5 kg e consiste na utilização de apenas um segmento (o II ou o III) do segmento lateral esquerdo. No entanto, este é um procedimento tecnicamente mais trabalhoso e potencialmente mais mórbido, com risco maior de lesão de estruturas vasculares e biliares, maior tempo de isquemia, e aumento da superfície cruenta do enxerto, o que pode provocar maior volume de sangramento do órgão após a reperfusão.

Com isso, devido ao aumento do número de transplantes em que o enxerto utilizado é desproporcionalmente grande para o receptor (*large-for-size*), é importante o melhor entendimento de potenciais lesões envolvidas nesse cenário.

A lesão de isquemia-reperfusão (IR) é um fenômeno no qual o dano celular num órgão submetido a isquemia é acentuado pelo restabelecimento do fluxo sanguíneo para esse órgão¹⁷. Além de estar presente no transplante, ocorre também em outras condições como nas ressecções hepáticas, trauma e choque. A lesão IR no transplante hepático pode ter como consequências a disfunção precoce do enxerto, a ativação da resposta imune predispondo a rejeição celular aguda e crônica e o aparecimento de lesões da via biliar¹⁸⁻²². A lesão IR envolve um período de isquemia em que as células na ausência de oxigênio passam a obter energia pela via

anaeróbica, seguido de reperfusão de um órgão com conseqüente início de uma cascata inflamatória²⁰.

As células de Kupffer, que são macrófagos presentes normalmente nos sinusóides hepáticos, são as células mais envolvidas na fase inicial desse processo. Elas liberam citocinas pró-inflamatórias, entre elas o fator de necrose tumoral alfa (*tumoral necrosis factor* - TNF- α) e interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) que atuam ativando os leucócitos, aumentando a produção de moléculas de adesão com conseqüente migração dessas células para o tecido hepático. As células de Kupffer e os leucócitos liberam espécies reativas de oxigênio e metaloproteinases que são responsáveis pela lesão celular. Além disso, o acúmulo de leucócitos ativados e de plaquetas leva ao distúrbio microcirculatório. Como evento final da cascata, ocorre a apoptose de células sinusoidais e hepatócitos e em último grau a disfunção orgânica²¹.

A apoptose é um evento celular fisiológico fundamental para a homeostase tecidual. Porém esse mecanismo pode ser desencadeado por situações patológicas, como a IR²³. A apoptose de células sinusoidais e de hepatócitos é o evento final da lesão IR hepática causada pela isquemia quente e fria durante o transplante e, além disso, é a principal modalidade de morte celular nos estágios iniciais da lesão IR²⁴⁻²⁶.

O processo da apoptose pode ser dividido em duas fases: iniciação e execução. Durante a primeira ocorre ativação das caspases (*cysteine asparagil specific proteases*) que, na fase seguinte, clivam proteínas celulares vitais e ativam endonucleases, o que leva a morte celular²⁷.

A iniciação da apoptose é um fenômeno complexo e pode ocorrer por duas vias, a intrínseca e a extrínseca, que depois se convergem para a ativação das caspases.

A via extrínseca é mediada por receptores (“receptores da morte”) existentes na membrana celular que, quando ativados, transmitem sinais intracelulares que por fim ativam as caspases. Os receptores mais comumente envolvidos nesse processo são os da superfamília de receptores do TNF (RTNF), incluindo o RTNF-1, Fas (CD95) (*First apoptosis signal – cluster differentiation*), DR-4 e DR-5 (*death receptors*).

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 (foram descobertas em pacientes com linfoma folicular, *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*)²⁸. 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.

Junnarkar *et al.* demonstraram que o uso da bucilamina (modulador dos genes pró e anti apoptóticos) atenua a lesão celular em ratos submetidos a isquemia seguida de reperfusão, com a diminuição na expressão do gene Bax e aumento na do gene Bcl-2²⁹. Já foi demonstrado que a expressão do gene Bax por si só já é capaz de induzir a apoptose. Além disso, camundongos *knockout* para o gene Bax demonstraram melhor tolerância a isquemia quente³⁰.

A cascata inflamatória deflagrada pelas células de Kupffer também é responsável por ativar mecanismos moleculares de reparo e regeneração celular. Essa ativação que é fundamental para a sobrevivência do enxerto é mediada principalmente pela IL-6. Essa citocina tem a função de ativar a via da regeneração a partir de fatores de transcrição, como o STAT-3 (*Signal Transduction and Activator of Transcription*)³¹⁻³³.

O equilíbrio microcirculatório é regulado por substâncias vasoativas como a endotelina e o óxido nítrico (NO). A endotelina é um potente vasoconstrictor e sua liberação resulta na constrição sinusoidal enquanto que o NO produz seu relaxamento. Após a reperfusão ocorre um desequilíbrio na relação endotelina/NO levando ao distúrbio microcirculatório³⁴.

O NO é um gás solúvel que atua de maneira parácrina e tem uma meia vida de poucos segundos. Ele é produzido pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS) que é encontrada em 3 formas distintas: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível por citocinas (iNOS). A eNOS e a nNOS são expressas normalmente nos tecidos e produzem pequenas quantidades de NO enquanto que a iNOS é produzida após

ativação dos macrófagos por citocinas e libera uma grande quantidade de NO no tecido³⁵⁻³⁷.

O papel do NO na lesão IR é complexo e ainda não totalmente esclarecido. Porém sabe-se que o NO produzido pela eNOS tem ação protetora mediada pela vasodilatação e inibição da agregação plaquetária, melhorando a microcirculação além de inibir a ativação de neutrófilos e neutralizar as espécies reativas de oxigênio. Entretanto, o NO proveniente da iNOS tem ação citotóxica. Essa ação se deve ao fato de que a liberação de NO em larga escala no tecido leva a interação do mesmo com radicais livres de oxigênio formando espécies reativas de nitrogênio como o peroxinitrito que por sua vez causam dano celular³⁵. Shi Y *et al.* demonstraram que a inibição da iNOS atenua a lesão hepática em ratos submetidos a transplante hepático com enxertos provenientes de doadores após parada cardíaca³⁸.

Koti *et al.* demonstraram em ratos submetidos a isquemia seguida de reperfusão, que o pré-condicionamento isquêmico (PCI) do fígado e o tratamento com a L-arginina (substrato para a formação do NO) levaram ao aumento da expressão de eNOS com consequente diminuição da lesão hepática³⁶.

O PCI foi descrito inicialmente no miocárdio em 1986, demonstrando que, em cães, episódios breves e repetidos de isquemia protegem a célula miocárdica de uma isquemia prolongada³⁹.

Posteriormente, o PCI foi descrito em outros órgãos como músculo esquelético, cérebro, medula espinhal, rim, intestino e fígado. Ele consiste num mecanismo adaptativo em que breves episódios de isquemia protegem um órgão da lesão de IR causada por uma isquemia prolongada. As principais substâncias responsáveis por esse efeito protetor são a adenosina, o trifosfato de adenosina

(ATP) e o NO que atuam diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio e a expressão de moléculas de adesão contribuindo com a melhora na microcirculação⁴⁰.

Além disso, foi demonstrado que PCI tem o papel de estimular a regeneração hepática^{41,42}. Esse efeito foi demonstrado em ratos submetidos a hepatectomia⁴¹ e a isquemia quente⁴² e que tem como provável mediadora a interleucina-6 (IL-6)⁴¹. Kannerup *et al.* demonstraram que o PCI aumenta a produção de IL-6 em suínos submetidos a isquemia quente⁴³. O PCI também tem efeito sobre a diminuição da apoptose das células do endotélio sinusoidal em modelos de IR hepática em ratos⁴⁴. No entanto, o papel do PCI na lesão de IR continua controverso. Estudos em suínos⁴⁵ e também em humanos^{46,47} não demonstraram benefício do PCI na proteção da lesão de IR.

Do ponto de vista histológico, a lesão IR se mostra com graus variáveis de lesão do endotélio sinusoidal, infiltração neutrofílica, balonização hepatocitária, bilirrubinostase, apoptose e necrose centrolobular. Em situações mais graves, ocorre o acometimento do trato biliar resultando em inflamação, proliferação ductular e fibrose. Essas alterações são vistas nos primeiros dias após o transplante e podem levar meses para resolução^{27,48}. Dessa forma, esses achados podem ser vistos em biópsias realizadas no pós operatório precoce quando a mesma está indicada para afastar rejeição celular aguda que, por sua vez, tem achados histológicos distintos⁴⁸.

Da mesma maneira, a dosagem sérica de enzimas hepatocelulares, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) também são úteis na avaliação da lesão hepatocelular. Elas estão presentes em maior quantidade na corrente sanguínea quando ocorre morte celular de hepatócitos. Classicamente, ocorre um pico dessas enzimas nas primeiras 24 horas após o transplante seguida de

queda progressiva até valores próximos do normal com o fim da primeira semana, desde que não ocorra a rejeição celular aguda. Apesar da elevação da AST e ALT estar também relacionada a lesões de outros órgãos como coração, músculo esquelético e cérebro, ela é uma boa medida para avaliação da integridade do hepatócito⁴⁹.

Na literatura existem descrições de diversos modelos animais de transplante hepático, utilizando desde animais de pequeno até grande porte⁵⁰⁻⁵². O uso de animais de pequeno porte tem como vantagem o fácil manuseio e baixo custo financeiro dos mesmos. Além disso, a disponibilidade de animais geneticamente modificados *knockout*, permite investigações precisas dos processos fisiopatológicos da lesão de IR^{30,53,54}.

Destacam-se também os modelos de xenotransplante⁵⁵ (transplante realizados entre espécies diferentes) e de transplantes auxiliares^{56,57} em casos de insuficiência hepática aguda e como perspectivas para o uso futuro em humanos^{55,58}.

Os transplantes utilizando porcos, apesar de serem de custo mais elevado de logística mais complexa, apresentam uma série de vantagens como a semelhança anatômica e de tamanho com as estruturas humanas, o que permite, além da realização de estudos científicos, o treinamento técnico da equipe.

Em suínos, são descritos modelos de transplante hepático com uso de *bypass* veno-venoso^{59,60}, que, apesar de manter a estabilidade hemodinâmica do animal na fase anepática, podem levar a distúrbios de coagulação e embolia⁶¹. A realização do transplante sem o uso de *bypass* é descrita em modelos em que a reperusão do fígado se dá após as anastomoses da veia cava supra-hepática e da veia porta apenas⁵², com o clampeamento da aorta supra-celíaca durante a fase anepática⁶² e

com a confecção das anastomoses dos dois segmentos da veia cava inferior e da veia porta em tempo menor do que 30 minutos⁶¹.

Existe descrição de modelo de *small-for-size*, realizando-se transplante hepático em porcos miniatura^{63,64}. No entanto, não há, na literatura, descrição de modelo de *large-for-size*, nem dos mecanismos de lesão hepática nesse cenário.

2. Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Padronizar um modelo experimental de transplante hepático *large-for-size*, realizando transplantes entre animais, sendo que o doador seja expressivamente maior do que o receptor;
2. Avaliar a lesão de isquemia reperfusão no modelo *large-for-size* utilizando-se métodos bioquímicos, histológicos e moleculares;
3. Avaliar o efeito do pré-condicionamento isquêmico no modelo *large-for-size*.

3. Métodos

3.1. Animal de experimentação

Foram utilizados porcos de ambos os sexos, 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.

Cada procedimento envolveu 2 animais, um receptor com aproximadamente 20 kg e um doador de enxerto hepático (fígado inteiro) e sangue com peso similar ao receptor ou pelo menos o dobro, dependendo do grupo de estudo.

Os animais permaneceram em jejum desde a noite da véspera do procedimento e foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos, sob anestesia geral, de acordo com as Normas do Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais – COBEA⁶⁵.

3.2. Plano Piloto

Todos os procedimentos foram realizados pelos mesmos dois cirurgiões. Foram operados 16 animais (total de 8 transplantes) com o objetivo de se padronizar e ter experiência quanto as técnicas anestésicas e cirúrgicas.

Os animais receberam injeção intra-muscular de 2 mg/kg de xilazina e 10 mg/kg de cloridrato de quetamina 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 20 G. A indução

anestésica foi realizada com a infusão de 3 mg/kg de propofol e foi seguida da intubação orotraqueal com cânula nº 6.5 com balão. Esse preparo inicial foi igual tanto para os animais doadores quanto para os receptores.

3.2.1. Cirurgia do doador

Os animais doadores foram mantidos em ventilação mecânica com aparelho de anestesia Takaoka® série Fuji Modelo-2604, sendo a anestesia mantida com Isoflurano 1,5% e 0,1 µg/kg/min de fentanil. A monitorização consistiu em cardioscópio, oximetria de pulso e capnógrafo por meio do monitor Dixtal® DX 2020. Iniciou-se o procedimento com uma incisão da fúrcula esternal até a pube com esternotomia e abertura do pericárdio e das cavidades pleurais (Figura 1).

Figura 1. Fotografia após esternotomia, abertura do abdome e das cavidades pleurais e pericárdica.

A veia esplênica foi então individualizada e uma cânula de cloreto de polivinila (PVC) 12 Fr instalada na mesma com a ponta posicionada no tronco da veia porta (Figura 2). Durante o procedimento, foi infundido 20 ml/kg de soro fisiológico para reposição volêmica e para que antes da perfusão fosse coletada uma bolsa de sangue total do animal. 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 para o intestino.

Figura 2. Fotografia mostrando a canulação da veia esplênica.

No momento da dissecação da aorta, foi administrado 100 mg/kg de heparina, e em seguida ela foi ligada em sua porção distal, logo acima da bifurcação das artérias ilíacas. Uma cânula de PVC 14 Fr foi introduzida na aorta e conectada a uma bolsa com anticoagulante (CPDA – *citrate phosphate dextrose adenine*) BAXTER® para que aproximadamente 300 ml de sangue total fosse coletado (Figura 3). Quando esse volume foi alcançado, a perfusão do fígado foi realizada.

Figura 3. Fotografia mostrando a canulação da aorta abdominal e a coleta de sangue.

Nos animais em que foi realizado o pré-condicionamento isquêmico, após a abertura da cavidade, todo o hilo hepático foi clampeado com uma pinça vascular. O fluxo foi interrompido por 15 minutos seguido de reperfusão por 15 minutos. Durante a reperfusão, foram instalados os cateteres na veia esplênica e na aorta como descrito anteriormente para a perfusão do enxerto.

A solução escolhida foi a de Euro Collins (Glicose 3,57% – Farmácia do Hospital das Clínicas da FMUSP) devido ao seu menor custo e maior facilidade de manipulação. Após início da perfusão, a aorta torácica foi clampeada e a artéria mesentérica superior tracionada com o objetivo de minimizar a perda de líquido de preservação e a veia cava superior seccionada junto ao átrio direito para permitir a drenagem de sangue e da solução. Durante a perfusão a cavidade abdominal foi

preenchida soro fisiológico congelado e triturado (Figura 4). Foram administrados 4 litros de solução de preservação (2 litros na veia porta e 2 litros na aorta) a 4 °C.

Figura 4. Fotografia mostrando o aspecto do fígado durante a perfusão.

O animal foi, então, desconectado do aparelho de ventilação e iniciou-se a retirada do fígado. A veia porta foi seccionada em sua porção proximal, junto a veia esplênica, a veia cava inferior junto da veia renal direita, o colédoco junto ao pâncreas e o órgão foi retirado com o tronco celíaco.

3.2.2. Cirurgia da bandeja

Seguiu-se então com a cirurgia da bandeja, nesse momento e até o implante o fígado foi mantido em bacia com 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. O órgão foi então acondicionado em bolsa plástica, após ser pesado, contendo solução de preservação a 4 °C (Figura 5).

Figura 5. Fotografia mostrando a cirurgia da bandeja e a veia porta apreendida pelas pinças.

3.2.3. Cirurgia do receptor

O animal receptor recebia a medicação pré-anestésica da mesma forma do que o doador e depois foi pesado. O mesmo foi mantido em decúbito dorsal, sobre colchão térmico mantido a 38 °C. A indução anestésica e intubação foi idêntica a dos animais doadores. A ventilação foi realizada com o aparelho de anestesia Dixtal® DX 5010. Por meio de uma cervicotomia direita, a veia jugular interna foi dissecada

para passagem de um cateter de duplo lúmen 7 Fr para administração de fluidos, medicações e drogas vasoativas durante o procedimento. A artéria carótida direita também foi isolada para a passagem de um cateter de PVC 8 Fr na mesma para aferição de pressão arterial. Os sinais vitais foram monitorados com cardioscópio, oximetria de pulso, pressão arterial invasiva, capnógrafo e termômetro esofágico em monitor Dixtal® DX 2020 (Figura 6 e 7).

Figura 6. Fotografia mostrando os cateteres instalados para monitorização hemodinâmica.

Figura 7. Fotografia mostrando a monitorização do animal receptor.

O plano anestésico foi mantido com a infusão contínua de 0,1 $\mu\text{g/kg/min}$ de fentanil e ventilação com 1,5% de isoflurano. Após antissepsia da pele e colocação dos campos operatórios, o animal foi submetido a uma pequena laparotomia infra-

umbilical mediana para instalação de um cateter do tipo Folley na bexiga para monitorização do débito urinário. Em seguida uma incisão em “J” abdominal foi então realizada para a realização do procedimento. Esse tipo de incisão expõe adequadamente o fígado e os elementos vasculares necessários para o procedimento e, com o auxílio de compressas cirúrgicas, evita a saída de alças intestinais da cavidade o que causa perda de líquido e queda de temperatura. (Figura 8).

A hepatectomia teve início com a liberação dos ligamentos redondo, falciforme, triangulares e hepatogástrico e em seguida a dissecação do hilo hepático. Essa foi realizada o mais próximo possível do parênquima hepático com o objetivo de se obter cotos vasculares e de via biliar com comprimentos adequados para a confecção das anastomoses. A dissecação foi conduzida de maneira cuidadosa para se evitar lesões das estruturas vasculares e hemorragias.

Figura 8. Fotografia mostrando a incisão em forma de “J”.

A via biliar principal foi dissecada e seccionada após ligadura logo abaixo do ducto cístico. A artéria hepática foi então identificada e seccionada após sua bifurcação. A veia porta foi amplamente dissecada e liberada (Figura 9). Em seguida a veia cava inferior foi isolada, primeiro sua porção infra-hepática (Figura 10) e depois sua porção supra-hepática (Figura 11).

A anatomia da veia cava inferior retro-hepática no porco tem um aspecto muito peculiar que a diferencia do humano e que no início do plano piloto dificultou a padronização do modelo. No porco, essa veia fica totalmente dentro do fígado impossibilitando a hepatectomia sem a retirada da mesma, o que é possível em humanos.

Figura 9. Fotografia mostrando a dissecção do hilo hepático e ampla exposição da veia porta.

Figura 10. Fotografia mostrando a veia cava inferior e sua porção infra-hepática.

Figura 11. Fotografia mostrando a mobilização do fígado e a veia cava inferior na sua porção supra-hepática.

Com isso, após a hepatectomia devido a diminuição acentuada do retorno venoso e a escassez de circulação colateral própria do animal, o mesmo evoluía com instabilidade hemodinâmica, choque e óbito. Foram realizadas 3 tentativas sem sucesso do transplante sem *bypass* veno-venoso ou outra manobra que mantivesse a estabilidade hemodinâmica nessa fase. O próximo passo foi então a tentativa da realização do procedimento utilizando-se, na fase anepática, o *bypass* veno-venoso conectando-se a veia femoral esquerda com a veia jugular esquerda. No entanto, utilização da bomba se mostrou pouco prática e dificultosa. Foram realizadas também 3 tentativas com esse método.

Baseado em modelos de transplante hepático em cães⁵¹ e em suínos⁶² e em modelos de exclusão hepática⁶⁶ também em cães, foi realizada a técnica de clampeamento da aorta supra-celíaca durante a fase anepática. Essa manobra se mostrou simples e eficaz em manter a estabilidade do animal. Foram realizados 2 experimentos no plano piloto dessa forma, sendo que um com animais de peso similar e outro com o doador com o dobro do peso do receptor. Durante o plano experimental todos os animais foram operados utilizando-se essa técnica.

Com isso, após disseção do hilo hepático, das duas porções da veia cava inferior, a aorta supra-celíaca foi dissecada e reparada logo abaixo do hiato diafragmático (Figura 12).

Figura 12. Fotografia mostrando a dissecação e isolamento da aorta supra-celíaca.

Imediatamente antes da retirada do fígado a aorta foi clampeada com uma pinça tipo Bulldog. A veia porta foi então ligada e seccionada acima de sua bifurcação, após a colocação de duas pinças vasculares do tipo Satinsky na veia cava inferior, uma em sua porção infra-hepática e outra na supra-hepática o fígado foi retirado. A retirada do fígado foi realizada cuidadosamente principalmente na porção supra-hepática para se obter cotos vasculares com comprimentos adequados para a anastomose (Figura 13).

Figura 13. Fotografia mostrando cavidade abdominal após retirada do fígado, com pinças vasculares na veia cava e na aorta.

O órgão foi retirado da bolsa plástica e a primeira anastomose realizada foi a da veia cava supra-hepática, com sutura contínua com fio de polipropileno 4-0 (Figura 14). Em seguida, foi confeccionada a anastomose da veia cava inferior com sutura contínua com fio de polipropileno 5-0, após a realização da parede posterior dessa anastomose, o fígado foi lavado com 1 litro de solução salina a 4 °C pela veia porta com o objetivo de lavar a solução de preservação (rica em potássio). Terminado esse passo a sutura da parede anterior foi finalizada (Figura 15).

Figura 14. Fotografia mostrando a anastomose da veia cava supra-hepática.

Figura 15. Fotografia mostrando a anastomose da veia cava infrahepática.

A seguir, a anastomose da veia porta foi executada com sutura contínua com fio de polipropileno 6-0 (Figura 16). Após essa etapa, o enxerto hepático foi reperfundido com a retirada das pinças vasculares na seguinte sequência: veia cava supra-hepática, veia cava infra hepática e veia porta. Imediatamente após a abertura dos clamps vasculares, a aorta supra-celíaca foi gradativamente liberada e o enxerto perfundido (Figura 17).

Figura 16. Fotografia mostrando a anastomose da veia porta.

No momento da reperfusão foi administrada solução salina com 1 mEq/kg de bicarbonato de sódio com o objetivo de corrigir a acidose que ocorre nessa fase e 1 mL/kg de gluconato de cálcio 10% com o intuito de antagonizar o efeito da hipercalemia no miocárdio. Nessa fase os animais evoluíram comumente com instabilidade hemodinâmica. Nos casos em que pressão arterial média caiu abaixo de

50 mmHg foi iniciada a infusão de noradrenalina por meio de bomba de infusão (Baxter® Colleague CX3).

Figura 17. Sequência de fotografias mostrando a perfusão do enxerto hepático. A última fotografia demonstra a desproporção do fígado implantado (animal do grupo LFS).

Após estabilização hemodinâmica, a anastomose arterial foi confeccionada com sutura com pontos separados utilizando fio de polipropileno 7-0 e lupa cirúrgica (aumento de 3,5 vezes Designs for Vision®). Para a reconstrução biliar, um segmento de 2 cm de sonda uretral de PVC 10 Fr foi colocado no ducto hepático do fígado transplantado e fixado com fio de algodão 2-0, mantendo-se 1 cm da sonda para fora que, por sua vez, fosse introduzido no ducto biliar do receptor e fixado da mesma forma. Em seguida, os dois fios de ligadura foram amarrados mantendo as extremidades coaptadas (Figura 18).

Os animais foram mantidos vivos por 3 horas após a reperfusão, quando o plano anestésico foi aprofundado com aumento da dose de isoflurano inalatório e foram sacrificados com injeção de 40 mL de cloreto de potássio a 10%. Os tempos de isquemia total e quente foram registrados em cada experimento.

Figura 18. Fotografia mostrando as anastomoses da artéria hepática e da via biliar.

Nessa fase 4 experimentos foram realizados com doadores que pesavam aproximadamente o dobro dos receptores (de 40 a 50 kg e de 18 a 23 kg, respectivamente). Com essa desproporção de peso entre os animais, a média da relação do peso do enxerto com peso do receptor foi de 6%, portanto, compatível com a situação *large-for-size*.

3.3. Plano Experimental

Nessa fase foram realizados 21 transplantes utilizando 42 animais. O preparo e o procedimento foram realizados conforme descrito no plano piloto. Os animais foram divididos em 3 grupos.

- Grupo 1 (n=7) – grupo controle, os animais doadores e receptores com peso semelhantes (aproximadamente 20kg)
- Grupo 2 (n=7) – grupo *large-for-size* (LFS), o peso dos animais doadores era aproximadamente o dobro do peso dos receptores (doadores com 40kg aproximadamente e receptores com 20kg)
- Grupo 3 (n=7) – grupo *large-for-size* + pré-condicionamento isquêmico (LFS+PCI), o peso dos animais era semelhante ao do grupo 2, porém era realizado o pré-condicionamento no doador como descrito no plano piloto.

Foram realizadas 3 coletas de sangue arterial no animal receptor:

- 1a coleta – basal, obtida logo após abertura da cavidade abdominal
- 2a coleta – obtida 1 hora após a reperfusão do enxerto hepático
- 3a coleta – obtida 3 horas após a reperfusão do enxerto hepático.

Com a amostra de sangue da primeira coleta foram obtidos apenas dados de gasometria e eletrólitos (sódio e potássio). As demais amostras foram utilizadas para análise bioquímica de enzimas hepatocelulares (ALT e AST) além de gasometria e dosagem de eletrólitos.

Além disso, 2 fragmentos de fígado foram obtidos por experimento:

- 1º fragmento – obtido do receptor 1 hora após a reperfusão do enxerto hepático

- 2º fragmento – obtido do receptor 3 horas após a reperfusão do enxerto hepático.

Cada fragmento foi dividido em duas partes: uma foi preservada em solução tamponada de formaldeído a 10% e, após ser incluída em bloco de parafina, foram obtidos cortes histológicos de 4 µm. Esses foram destinados à avaliação histológica pela coloração hematoxilina-eosina (HE). A outra parte foi congelada em nitrogênio líquido a -70 °C para estudos moleculares que serão descritos a seguir.

3.3.1. Análise de parâmetros hemodinâmicos

Os valores de pressão arterial média invasiva (PAM) foram obtidos a partir de medidas realizadas por meio de cateter inserido na artéria carótida direita nos animais receptores e registradas em monitor DIXTAL® DX 2020 e expressas em mmHg. Nesses animais, os valores de frequência cardíaca (FC) foram registrados por cardioscópio do mesmo monitor e expressos em batimentos por minuto (bpm).

Ambas medidas foram analisadas nos seguintes momentos:

- 1: basal – imediatamente antes do início da laparotomia;
- 2: durante o clampeamento da aorta;
- 3: 10 minutos após a reperfusão;
- 4: 3 horas após reperfusão.

3.3.2. Análise de gasometria arterial, sódio e potássio

As amostras foram analisadas para avaliação do equilíbrio ácido-base e hidroeletrólítico nos períodos descritos. Elas foram processadas por meio do aparelho ABL 800 Flex (Radiometer®), o potencial hidrogeniônico (pH) foi quantificado por galvanometria enquanto que os eletrólitos por potenciometria direta empregando eletrodos íons-seletivos.

3.3.3. Análise das enzimas hepáticas

As enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram analisadas como indicadores de lesão hepática 1 e 3 horas após a reperfusão do enxerto hepático. As quantificações foram realizadas pelo método colorimétrico (COBAS 6000, Roche®). Os resultados foram expressos em unidades por litro (U/L).

3.3.4. Análise histológica

As lâminas foram preparadas no Laboratório de Investigação Médica em Cirurgia Pediátrica (LIM 30) da FMUSP e foram analisadas por um único patologista sem conhecimento dos grupos estudados. Foram avaliados os seguintes achados: a) Necrose centrolobular; b) presença de neutrófilos sinusoidais; c) estatose hepática; d) corpos apoptóticos; e) dilatação sinusoidal. Cada variável foi avaliada de maneira semiquantitativa atribuindo-se uma pontuação de 0 a 4, conforme descrição a seguir:

- 0: ausência do achado;
- 1: alteração discreta;
- 2: alteração moderada;
- 3: alteração intensa e
- 4: alteração muito intensa.

3.3.5. Análise Molecular

Os estudos que envolveram técnicas de biologia molecular foram realizados no Laboratório de Investigação Médica em Cirurgia Pediátrica (LIM 30) da FMUSP.

Extração do ácido ribonucleico (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- Dismembrenator U SARTORIUS, Germany) após adição de nitrogênio líquido. O pulverizado foi homogeneizado em 700 µl 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 µl 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-clororórmio), uma interfase (proteínas), e uma

superior, incolor e aquosa. Esta última que contém o ARN foi transferida para um tubo limpo em que 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 precipitou no fundo do tubo ao término da centrifugação. Este foi ressuspenso em água bidestilada tratada com 0,01% de Dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenado a -80 °C.

A concentração de ARN foi determinada com a utilização de espectrofotômetro para análises qualitativas e quantitativas 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.

Transcrição Reversa

Um micrograma de ARN total de cada amostra foi utilizado na síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cADN) através da utilização 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, 0,1 M de dithiotreitol, 500 µM de cada um dos deoxinucleotídeos, 200 unidades de SuperScript III, para volume total de 20 µl que foi processada a 37 °C durante 1 hora.

Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa (qRT-PCR ou RT-PCR)

Por meio dessa técnica foram avaliadas a expressão dos genes relacionados a apoptose, Bax (pró-apoptótico) e Bcl-XL (antiapoptótico), do gene relacionado à proliferação celular (IL-6) e do gene eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*). 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 também padronizadas as condições de temperatura, concentração de *primers* e a eficiência das reações de amplificação dos genes Bax (pró-apoptótico) e β -actina. Foi elaborada uma curva com diluições seriadas da concentração de cADN para assumir a eficiência da reação desses genes, o que tornou possível a avaliação da expressão dos mesmos.

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 5 plex 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.

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 (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 os genes internos.

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) 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.

Tabela 1 – Descrição dos *primers* utilizados para amplificação dos genes

gene	<i>primers</i>
β actina	Sense: 5'-tcc aga ggc gct ctt cca-3' Antisense: 5'-cgc act tca tga tcg agt tga-3'
Bax	Sense : 5'-ctg gga ctt ctt gct gga ttt gc -3' Antisense: 5'-cag ggt gaa gca ggt gaa gat c -3'
Bcl-XL	Sense : 5'-gga gct ggt ggt tga ctt tc-3' Antisense: 5'-gtt tcc tct tct gat tca gtc-3'
eNOS	Sense: 5'-aca tct gca acc aca tca agt acg-3' Antisense: 5'-cac cag ttg gct gtt cca gat c-3'
IL-6	Sense: 5'-cga gcc cac cag gaa cga aag -3' Antisense: 5'-aag cag ccc cag gga gaa ggc -3'

(a – adenina; g – guanina; c – citosina; t – timidina)

Análise dos resultados da qRT-PCR

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, o nível 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 mostra 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 utilizando-se a seguinte equação:

$$RQ=2^{-\Delta\Delta CT}.$$

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

Para avaliar o desempenho da reação de qRT-PCR em termos de eficiência, intervalo de precisão linear de quantificação e sensibilidade, dados gerados a partir de uma diluição seriada de amostras com concentrações conhecidas (curva padrão)

são um excelente meio de determinação do desempenho global de um ensaio de qRT-PCR. A série de diluições deve abranger uma ampla gama de concentrações (no mínimo 4 pontos) para garantir que a reação seja executada em igual eficiência para as diferentes concentrações de cADN. A fim de se obter resultados reprodutíveis e com exatidão, a eficiência da reação deve ser próxima a 100%, ou seja, a quantidade de DNA deve duplicar após cada ciclo da fase exponencial.

Nesse estudo, para testar a eficiência de amplificação de cada um dos genes, diluições seriadas de cADN foram testadas. Realizamos uma curva de cinco pontos diluídos por um fator de 10 (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10.000; 1:100.000) a partir de um *pool* contendo cADN extraído de todos os animais doadores.

Os resultados da reação foram tabelados para o cálculo da equação de regressão do R-quadrado (R^2). A curva padrão foi construída e o valor da inclinação da reta, que indica a sensibilidade do teste, permitiu o cálculo da eficiência da reação. A curva padrão demonstra o log da quantidade de amostra inicial contra o número de ciclos da qRT-PCR, e é gerada pelo software do equipamento. Os valores aceitáveis para as aplicações que requerem quantificação exata são determinados por uma correlação linear, com um determinado fator de inclinação da curva para proporcionar um cálculo de eficiência de reação de 90-110%.

As equações de regressão linear obtidas mostraram boas condições de amplificação e correlação positiva entre as variáveis observadas nas diluições sucessivas, gerando uma ótima eficiência de amplificação.

Ao final do ciclo de amplificação de cada gene foi realizada a curva de *melting* ou dissociação. Por ser um intercalante de dupla fita de ADN o corante fluorescente SYBR Green I, nos permite quantificar o produto de PCR. No entanto,

esta metodologia não nos permite distinguir se o material quantificado é realmente o produto investigado ou outro artefato da reação. Uma importante medida de controle da qualidade do produto da PCR é a verificação da curva de dissociação em todas as amostras. A temperatura de dissociação depende da composição de bases nitrogenadas e do tamanho do produto amplificado. Desta forma, todo o produto de PCR de um *primer* específico apresentará uma mesma temperatura de *melting*. Caso isto não aconteça, algum dos seguintes eventos pode ter ocorrido: contaminação, formação de dímeros de *primers* ou *mispriming* (pareamento em regiões não homólogas).

Durante a curva de dissociação a temperatura é elevada gradualmente e o aparelho capta a mudança na emissão de fluorescência. No ponto de dissociação (Temperatura de *Melting* = T_M), a dupla fita de ADN irá se separar e a fluorescência irá diminuir. O software do aparelho fornece um gráfico que confronta esta perda de fluorescência emitindo o ponto exato da dissociação da dupla fita de ADN.

As amostras que apresentaram curvas de dissociação com temperaturas diferentes ou apresentaram mais de um ponto de dissociação em uma mesma amostra foram repetidas, e quando necessário foi sintetizado um novo cADN. Tal preocupação se deve pelo motivo de possível material contaminante na amostra de cADN.

Com a finalidade de exemplificação, os Gráficos 1 a 7 demonstram as curvas e gráficos de eficiência bem como a curva *melting* dos genes Bax e da β -actina.

Gráfico 1. Curva de eficiência do gene Bax.

Curva para verificar a eficiência de amplificação dos *primers* em diluições seriadas de cADN.

Gráfico 2. Gráfico da eficiência do gene Bax.

O eixo “x” representa a concentração de cDNA (escala logarítmica) e no eixo “y” encontram-se os “CTs” de cada diluição do gene Bax formados pela curva de eficiência.

Gráfico 3. Curva de eficiência do gene β -actina.

Curva de amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos *primers* em diluições seriadas de cADN.

Gráfico 4. Gráfico da eficiência do gene β -actina.

O eixo “x” representa a concentração de cDNA (escala logarítmica) e no eixo “y” encontram-se os “CTs” de cada diluição do gene da β -actina formados pela curva de eficiência.

Gráfico 5. Curva de *melting* do gene Bax.

Curva de *melting* para confirmar a pureza das amostras estudadas. A formação de um único pico indica qualidade da reação (ausência de contaminantes ou produtos inespecíficos)

Gráfico 6. Curva de *melting* do gene β -actina.

Curva de *melting* para confirmar a pureza das amostras estudadas. A formação de um único pico indica qualidade da reação (ausência de contaminantes ou produtos inespecíficos).

Gráfico 7. Curva de amplificação de RT-PCR Real Time.

O traço horizontal vermelho representa o limiar de detecção da fluorescência (*threshold*). A quantidade de produto amplificado na reação produz uma curva de amplificação que ultrapassa o limiar de detecção, denominada CT (*Threshold Cycle*).

3.3.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram armazenados num banco eletrônico do Microsoft Excel e foram transferidos para o software R (www.r-project.org) para análise estatística e confecção dos gráficos. O nível de significância adotado foi de 5% em todos os testes. Para verificar a existência de diferença entre os grupos foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando houve diferença estatística foi aplicado o teste de Dunn com correção de Bonferroni para análise dois a dois.

4. Resultados

Nesse capítulo, para melhor compreensão, serão apresentados os resultados mais relevantes sob forma de gráficos, sendo que os valores individuais das variáveis estão expostos em ANEXOS.

4.1. Mortalidade dos animais

No total de 21 transplantes (7 em cada grupo), verificou-se 28% (6 animais) de mortalidade, sendo 2 em cada grupo. Os óbitos foram causados por: hemorragia proveniente de lesão da cápsula hepática (1 no grupo controle e 2 no grupo LFS+PCI) e instabilidade hemodinâmica logo após a liberação do clampeamento da aorta (1 no grupo controle e 2 no grupo LFS).

4.2. Análise do peso dos animais receptores e doadores e da relação peso do fígado e peso do receptor

Não houve diferença entre os pesos dos animais receptores nos 3 grupos estudados (Gráfico 8). Já o peso dos doadores foi estatisticamente maior nos grupos LFS e LFS+PCI do que no grupo controle (Gráfico 9), da mesma forma, a relação peso do fígado e peso do receptor (GBWR) foi maior nesses grupos (Gráfico 10). Além disso, não houve diferença entre os grupos LFS e LFS+PCI.

Gráfico 8. Valores obtidos e médias (barras), em kg, dos pesos dos animais receptores.

Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,77$

Gráfico 9. Valores obtidos e médias (barras), em kg, dos pesos dos animais doadores.

Teste de Bonferroni:

Controle x LFS: $p= 0,005$ Controle x LFS+PCI: $p=0,001$

LFS x LFS+PCI: $p>0,05$

Gráfico 10. Valores obtidos e médias (barras) da relação dos pesos dos fígados e pesos dos animais receptores.

Teste de Bonferroni:

Controle x LFS: $p=0,001$ Controle x LFS+PCI: $p=0,004$

LFS x LFS+PCI: $p>0,05$

4.3. Análise dos tempos de isquemia total e quente

Os tempos de isquemia total e quente foram semelhantes em todos os grupos estudados (Gráficos 11 e 12).

Gráfico 11. Valores obtidos e médias (barras), em minutos, dos tempos de isquemia total.

Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,37$

Gráfico 12. Valores obtidos e médias (barras), em minutos, dos tempos de isquemia quente.

Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,56$

4.4. Análise de parâmetros hemodinâmicos

Os valores de PAM e FC não apresentaram diferença entre os grupos em nenhum dos intervalos estudados.

4.5. Análise de gasometria arterial, sódio e potássio

Não houve diferença entre os grupos nos valores de pH em nenhuma amostra analisada (basal, 1 e 3 horas após reperfusão).

Com relação ao sódio, os valores obtidos foram semelhantes nas medidas basal e 3 horas após reperfusão, enquanto que foi significativamente maior no grupo controle do que nos demais na amostra obtida 1 hora após reperfusão (Gráfico 13).

Gráfico 13. Valores obtidos e médias (barras), em mEq/L, das dosagens séricas de sódio 1 hora após reperfusão.

Teste de Bonferroni:

Controle x LFS: $p=0,021$ Controle x LFS+PCI: $p=0,047$

LFS x LFS+PCI: $p>0,05$

Já as dosagens séricas de potássio foram semelhantes também nos valores iniciais e após 3 horas de reperfusão. Os valores no grupo controle foram significativamente menores do que nos grupos LFS e LFS+PCI (Gráfico 14) após 1 hora de reperfusão.

Gráfico 14. Valores obtidos e médias (barras), em mEq/L, das dosagens séricas de potássio 1 hora após reperfusão.

Teste de Bonferroni:

Controle x LFS: $p=0,028$ Controle x LFS+PCI: $p=0,004$

LFS x LFS+PCI: $p>0,05$

4.6. Análise de enzimas hepáticas

Os níveis séricos de AST tanto 1 quanto 3 horas após a reperfusão foram significativamente menores no grupo controle do que nos grupos LFS e LFS+PCI. Entre esses últimos, não houve diferença estatisticamente significativa (Gráfico 15 e 16).

Com relação a análise da ALT, houve uma tendência de níveis séricos mais elevados nos grupos LFS e LFS+PCI (Gráfico 17 e 18).

Gráfico 15. Valores obtidos e médias (barras), em U/L, das dosagens séricas de AST 1 hora após a reperfusão.

Teste de Bonferroni:

Controle x LFS: $p=0,013$ Controle x LFS+PCI: $p=0,002$

LFS x LFS+PCI: $p>0,05$

Gráfico 16. Valores obtidos e médias (barras), em U/L, das dosagens séricas de AST 3 horas após a reperfusão.

Teste de Bonferroni:

Controle x LFS: $p=0,01$ Controle x LFS+PCI: $p=0,01$

LFS x LFS+PCI: $p>0,05$

Gráfico 17. Valores obtidos e médias (barras), em U/L, das dosagens séricas de ALT 1 hora após a reperfusão.

Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,19$

Gráfico 18. Valores obtidos e médias (barras), em U/L, das dosagens séricas de ALT 3 horas após a reperfusão.

Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,06$

4.7. Análise histológica

Dentre os critérios analisados: necrose centrolobular, esteatose, neutrófilos sinusoidais, presença de corpos apoptóticos e dilatação sinusoidal, as alterações mais frequentes foram a presença de neutrófilos sinusoidais e a dilatação sinusoidal (Gráficos 19, 20, 21 e 22) (Figura 19), porém nenhum deles mostrou diferença nos grupos estudados.

Gráfico 19. Valores obtidos e médias (barras) dos escores da avaliação histológica 1 hora após a reperfusão.

Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,9$

Gráfico 20. Valores obtidos e médias (barras) dos escores da avaliação histológica 3 horas após a reperfusão.

Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,95$

Gráfico 21. Valores obtidos e médias (barras) dos escores da avaliação histológica 1 hora após a reperfusão.

Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,39$

Gráfico 22. Valores obtidos e médias (barras) dos escores da avaliação histológica 3 horas após a reperfusão.

Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,76$

Figura 19. Microfotografias mostrando as alterações histológicas encontradas após 3 horas de reperfusão. As setas cheias indicam os neutrófilos sinusoidais e as tracejadas esteatose microgoticular. A – grupo controle; B – LFS; C – LFS+PCI (aumento de 200 vezes).

4.8. Análise molecular

4.8.1. Expressão do gene Bax (pró-apoptótico)

Na amostra obtida 1 hora após a reperfusão não houve diferença na expressão do gene, no entanto, houve uma tendência de maior expressão no grupo LFS (Gráfico 23).

Gráfico 23. Valores obtidos e médias (barras) das quantificações relativas da expressão do gene Bax 1 hora após a reperfusão.

Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,08$

Já na amostra obtida 3 horas após a reperfusão, a expressão do gene Bax no grupo LFS foi estatisticamente maior do que a observada nos grupos controle e LFS+PCI (Gráfico 24).

Gráfico 24. Valores obtidos e médias (barras) das quantificações relativas da expressão do gene Bax 3 horas após a reperusão.

Teste de Bonferroni:

Controle x LFS: $p= 0,004$ Controle x LFS+PCI: $p>0,05$

LFS x LFS+PCI: $p=0,002$

4.8.2. Expressão do gene Bcl-XL (anti-apoptótico)

A expressão do gene Bcl-XL não apresentou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos intervalos (Gráfico 25 e 26).

Gráfico 25. Valores obtidos e médias (barras) das quantificações relativas da expressão do gene Bcl-XL 1 hora após a reperusão.

Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,54$

Gráfico 26. Valores obtidos e médias (barras) das quantificações relativas da expressão do gene Bcl-XL 3 horas após a reperfusão.

Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,12$

4.8.3. Expressão do gene eNOS

Após 1 hora de reperfusão a expressão do gene foi significativamente maior no grupo LFS+PCI quando comparado ao grupo controle, enquanto que não houve diferença entre os grupos controle e LFS (Gráfico 27).

Já na amostra obtida 3 horas após a reperfusão, a expressão do gene foi significativamente maior no grupo LFS+PCI do que nos demais e essa diferença foi mais exuberante do que no intervalo anterior (Gráfico 28).

Gráfico 27. Valores obtidos e médias (barras) das quantificações relativas da expressão do gene eNOS 1 hora após a reperfusão.

Teste de Bonferroni:

Controle x LFS: $p > 0,05$

Controle x LFS+PCI: $p = 0,003$

LFS x LFS+PCI: $p > 0,05$

Gráfico 28. Valores obtidos e médias (barras) das quantificações relativas da expressão do gene eNOS 3 horas após a reperfusão.

Teste de Bonferroni:

Controle x LFS: $p > 0,05$

Controle x LFS+PCI: $p = 0,028$

LFS x LFS+PCI: $p = 0,005$

4.8.4. Expressão do gene IL-6

A expressão do gene 1 hora após a reperfusão não apresentou diferença entre os grupos. Entretanto, após 3 horas da reperfusão, a expressão de IL-6 foi significativamente mais elevada no grupo LFS+PCI do que no controle (Gráfico 29).

Gráfico 29. Valores obtidos e médias (barras) das quantificações relativas da expressão do gene IL-6 3 horas após a reperusão.

Teste de Bonferroni:

Controle x LFS: $p > 0,05$

Controle x LFS+PCI: $p = 0,03$

LFS x LFS+PCI: $p > 0,05$

5. Discussão

O desenvolvimento de modelos experimentais é de fundamental importância para o estudo e melhor entendimento de eventos biológicos presentes em cenários provenientes da prática clínica, bem como para o treinamento técnico de toda equipe envolvida⁶⁷. O transplante hepático é tratamento bem estabelecido para pacientes com doença hepática em estado terminal, inclusive em crianças. No entanto, essa terapêutica é extremamente complexa, não só pela dificuldade técnica do procedimento como pelos cuidados pós-operatórios e potenciais complicações¹.

Dentro de toda complexidade que envolve o transplante hepático em crianças, a desproporção entre o peso dos receptores (cada vez menores) e enxertos hepáticos que na maioria das vezes são provenientes de adultos (*large-for-size*) é um fato conhecido porém não totalmente esclarecido e estudado.

Schulze *et al.* demonstraram não haver diferença nas complicações pós-operatórias quando se compara os resultados do transplante hepático em crianças na situação *large-for-size* com crianças que receberam um enxerto de tamanho adequado. No entanto, o foco desse estudo foi em complicações vasculares, biliares, perfuração intestinal e tempo de internação hospitalar. Dessa forma, não foram analisadas variáveis que avaliem a lesão de IR no cenário *large-for-size*⁶⁸. A situação “inversa”, conhecido como *small-for-size* é, por sua vez, mais bem caracterizada tanto do ponto de vista experimental⁶⁴ quanto clínico⁶⁹.

Não há na literatura um modelo experimental de transplante hepático *large-for-size* em animais de grande porte. Sabe-se que até 60% das indicações de transplante hepático em crianças se deve a atresia das vias biliares, afecção que durante sua evolução cursa com hipoplasia e, em alguns casos trombose da veia porta e que essas crianças estão sendo transplantadas cada vez mais cedo. O baixo fluxo na

veia porta dificulta a perfusão do enxerto e essa dificuldade deve ser ainda mais intensa quando o enxerto é maior. Visto isso, é de fundamental importância o melhor entendimento dos mecanismos de lesão tanto precoces quanto tardios na condição *large-for-size*.

Os modelos experimentais de transplante hepático envolvem desde animais de pequeno até animais de grande porte⁵⁰⁻⁵², sendo que cada porte de animal apresenta suas vantagens e desvantagens. Apesar de ser de maior custo e de logística mais complexa, foi decidido pelo uso de porcos pela semelhança anatômica e fisiológica com humanos contribuindo também com o aprimoramento técnico da equipe.

O presente estudo foi desenvolvido em conjunto pelas disciplinas de Cirurgia Pediátrica e Transplante Hepático e de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da FMUSP e seus Laboratórios de Investigação Médica (LIM 30 e 26, respectivamente). Dessa forma foi possível a otimização dos recursos humanos e de infraestrutura de cada laboratório.

A padronização do modelo foi o primeiro passo, inicialmente, como descrito em Métodos. Foi feita a tentativa de realização do transplante sem a utilização de *bypass* veno-venoso durante a fase anepática, porém os animais evoluíam com instabilidade hemodinâmica grave e óbito. A utilização do *bypass* nessa fase se mostrou pouco prática e com potenciais complicações que dificultariam a execução do experimento, tais como sangramento e embolia⁶¹.

O clampeamento da aorta supra-celíaca é uma manobra comumente realizada na cirurgia de correção de aneurisma da aorta abdominal e, portanto, as alterações hemodinâmicas decorrentes dela são bem conhecidas^{62,70}. Após o clampeamento,

ocorre um aumento abrupto na pressão arterial e na resistência vascular periférica, alterações essas que contrapõem os distúrbios hemodinâmicos que ocorrem na fase anepática.

Por outro lado, existem potenciais complicações decorrentes dessa manobra, entre elas a diminuição da extração tissular de oxigênio pela intensa liberação de adrenalina que altera a curva de dissociação da hemoglobina para a esquerda⁷⁰ e a isquemia renal, intestinal, de medula espinhal e de membros são potencialmente prejudiciais podendo levar a lesões irreversíveis. No entanto, o tempo médio de clampeamento foi de 46,2 minutos nesse trabalho o que é compatível com o tempo tolerável descrito na literatura⁶².

A técnica de clampeamento da aorta supra-celíaca durante a fase anepática para transplante hepático experimental foi descrita inicialmente em cães por Isman *et al.*⁵¹, posteriormente, Lopez-Santamaria *et al.*⁶² também descreveram essa manobra num modelo em suínos. Nesse estudo os autores observaram que quando o transplante foi realizado sem *bypass* veno-venoso e sem clampeamento da aorta, os animais apresentavam distúrbios hemodinâmicos graves o que não ocorria com aqueles em que o clampeamento era realizado.

A interrupção do fluxo da aorta leva a isquemia do segmento inferior do animal, incluindo o intestino e os rins, com isso podendo potencializar a lesão IR, no entanto, Cruz *et al.* demonstraram num modelo em cães que essa manobra evita a hipotensão arterial e distúrbios na perfusão sistêmica e esplâncnica ocasionadas pela exclusão hepática⁶⁶. Com isso, foi verificado que a oclusão da aorta supra-celíaca é de simples execução e reprodução além de ser eficaz para a realização do transplante sendo adotada para todos os grupos.

Dessa forma, como o clampeamento supra-celíaco da aorta foi realizado em todos os grupos com a mesma duração, foi possível comparar a intensidade da lesão de IR e o efeito do PCI entre os grupos estudados.

No presente trabalho, o clampeamento da aorta resultou num aumento da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) em todos os grupos. Após a reperfusão houve queda acentuada na PAM enquanto que a FC manteve-se elevada devido ao choque. Esse efeito foi verificado em todos os grupos e foram de intensidades semelhantes, o que permite comparar melhor as demais variáveis de lesão hepática.

A padronização do intervalo do PCI foi baseada na revisão da literatura. Schulz *et al.* demonstraram em um estudo de isquemia quente realizado em porcos que o PCI com intervalos de 10 minutos não teve efeito protetor na lesão IR⁴⁵, enquanto que estudos com tempos maiores de PCI (15 minutos) demonstraram esse efeito⁷¹.

Todos os procedimentos foram realizados pela mesma equipe: cirurgiões e anestesista. Além disso, os tempos de isquemia tanto fria quanto quente foram similares entre os grupos o que também possibilita a comparação entre os mesmos.

A relação peso do enxerto e peso do receptor foi significativamente mais elevada nos grupos LFS e LFS+PCI (média 6,3% e 6,4%, respectivamente). Essa relação é compatível com o que ocorre no transplante hepático em crianças^{10,68}. Dessa forma, o modelo apresentado é adequado para a avaliação da repercussão do cenário *large-for-size* na lesão hepática. O estudo foi conduzido para a avaliação de lesões agudas nessa situação.

No presente trabalho, os animais de todos os grupos evoluíram com acidose após a reperfusão, semelhante à prática clínica, porém os valores de pH não apresentaram diferença entre os grupos. Isso permite analisar as diferenças entre as lesões encontradas como sendo atribuídas à desproporção do peso do enxerto hepático e não a um desequilíbrio metabólico de um determinado grupo.

Outra alteração metabólica encontrada foi a hipercalemia, principalmente na primeira hora após a reperfusão. Essa condição também é similar com o transplante em humanos. A fonte principal de potássio nessa situação é o enxerto hepático que fica armazenado em solução de preservação resfriada. Durante essa fase o potássio sai do meio intracelular para o extracelular e, apesar da lavagem do enxerto, após a reperfusão, uma grande quantidade de potássio é liberada na corrente sanguínea^{72,73}. Com o funcionamento do fígado, o potássio sérico tende diminuir⁷³. A hipercalemia imediatamente após a reperfusão pode levar a parada cardíaca, o que pode explicar o óbito em 3 animais.

A elevação do potássio foi maior nos grupos LFS e LFS+PCI e, conforme descrito acima, isso pode ser atribuído a maior massa de enxerto hepático implantado. Após 3 horas os níveis séricos dos grupos LFS e LFS+PCI se encontravam mais baixos, comparáveis com os do grupo controle.

Já a alteração intraoperatória da natremia é menos discutida na literatura. Sabe-se que os pacientes com doença hepática terminal evoluem com hiponatremia devido ao aumento da retenção de água livre pelo rim⁷⁴. Essa alteração metabólica é associada com aumento de mortalidade em pacientes cirróticos. A administração de soluções ricas em sódio tais como plasma fresco congelado, albumina e concentrado

de hemácias são as principais responsáveis pela correção rápida desse distúrbio o que pode acarretar a mielinólise pontina central^{75,76}.

No entanto, no presente estudo foram utilizados animais saudáveis e, portanto, sem hiponatremia prévia. Foi observado que uma hora após a reperfusão a dosagem de sódio foi mais elevada no grupo controle do que nos demais. Sabe-se que durante um período de isquemia ocorre edema celular devido ao influxo de sódio e água para o meio intracelular⁷⁷. Dessa forma, como a massa hepática é maior nos grupos LFS e LFS+PCI, esse resultado pode ter como causa um maior acúmulo de sódio intracelular nesses grupos.

A lesão de IR vem sendo apontada como uma das principais causas na disfunção do enxerto pós transplante contribuindo para diminuição de sobrevida do enxerto e do paciente¹⁸⁻²⁰. Portanto, a identificação de fatores que contribuem para um aumento dessa lesão bem como de medidas que a atenuem é fundamental para a melhoria nos resultados finais de sobrevida.

Essa lesão está presente em diversas condições clínicas tais como os transplantes de órgãos, choque hipovolêmico, trauma, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral. Essas situações têm como denominador comum um período de diminuição ou privação de fluxo sanguíneo seguido de seu restabelecimento com consequente lesão tecidual secundária. A lesão de IR no fígado tem como principais componentes a ativação de células de Kupffer com liberação de citocinas pró-inflamatórias, aumento da expressão de moléculas de adesão, recrutamento de neutrófilos para o tecido, distúrbio microcirculatório culminando com a apoptose, principal modalidade de morte celular nessa situação²⁰.

Como dito anteriormente, um mecanismo que atenua a lesão de IR é o PCI. Lloris-Carsi *et al.* foram os primeiros a demonstrar o benefício do PCI na proteção da lesão de IR no fígado. Os ratos que foram submetidos ao PCI (5 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperfusão) tiveram melhor sobrevida e níveis de enzimas mais baixos após isquemia quente de 90 minutos⁷⁸. Depois disso uma série de estudos em modelos de isquemia total e parcial em ratos confirmaram esse efeito protetor, demonstrando diminuição da lesão hepatocelular^{79,80}, melhora na microcirculação^{81,82} mediado pelo NO e diminuição da apoptose de hepatócitos entre outros efeitos⁸³.

A proteção do PCI também é demonstrada em modelos que envolvem isquemia fria, incluindo modelos de transplante hepático. Arai *et al.* analisaram o efeito do PCI em fígado de ratos armazenados em solução de Belzer e concluíram que nos ratos em que o PCI era realizado antes do armazenamento, houve uma diminuição da ativação das células de Kupffer e da lesão das células do endotélio sinusoidal^{84,85}. Um outro estudo utilizando perfusão isolada de fígado de ratos verificou que o PCI diminui a apoptose de células endoteliais e a atividade de proteases⁸⁶.

Compagnon *et al.* demonstraram em um modelo canino que o PCI protege o fígado apenas na isquemia normotérmica e não na hipotérmica. No entanto, nesse estudo o tempo de pré-condicionamento foi de apenas 10 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperfusão e além disso o fígado era submetido a 48 horas de isquemia fria o que pode ter contribuído com a anulação do efeito benéfico do PCI⁸⁷.

Na prática clínica, a primeira descrição do PCI foi em pacientes submetidos a hepatectomia⁸⁸. Esse estudo demonstrou que o PCI tem o efeito protetor na lesão hepática, mais pronunciado em pacientes jovens e com esteatose^{88,89}. Já o PCI em pacientes submetidos ao transplante hepático tem papel controverso na literatura. Alguns estudos demonstraram a redução da lesão de IR do ponto de vista bioquímico (diminuição das transaminases). No entanto, Koneru *et al.* não verificaram esse efeito (efeito paradoxal do PCI)⁴⁷ e, além disso, não existem estudos que avaliem a longo prazo o benefício do PCI, como avaliação do tempo de sobrevida do enxerto.

No presente estudo, a lesão hepática causada pela IR e o papel do PCI foram avaliados de diferentes formas. Primeiramente foram analisados do ponto de vista bioquímico, utilizando-se as dosagens séricas de transaminases. Apesar de também estarem relacionadas a lesões de outros órgãos, as transaminases são comumente utilizadas para avaliação de lesão hepatocelular tanto na prática clínica quanto em modelos experimentais.

Analisando os dados obtidos, observou-se elevação de AST mais acentuada nos grupos LFS e LFS+PCI quando comparados ao controle nos dois intervalos estudados. Esse achado ressalta o potencial efeito deletério do implante de um enxerto hepático desproporcional ao peso do receptor. Na primeira hora houve uma tendência de aumento mais pronunciado no grupo LFS+PCI, porém isso se inverteu após 3 horas de reperfusão.

A análise da ALT não demonstrou diferença nos intervalos estudados, porém houve uma tendência a valores mais elevados nos grupos LFS e LFS+PCI. Sabe-se que a elevação de ALT não é concomitante com a de AST em modelos suínos e, por

isso, a maioria dos estudos de lesão hepática nesses animais cita apenas os valores de AST sem mencionar os de ALT⁴⁹.

Com relação à análise histológica, não houve nenhuma diferença entre os grupos. Esse resultado é provavelmente justificado pelo fato do estudo ter sido conduzido para análise apenas da fase aguda. Apesar disso, foram encontradas algumas alterações típicas da lesão de reperfusão, como a dilatação sinusoidal, a presença de neutrófilos no sinusóide e a esteatose. A utilização de técnicas de análise histológica mais sofisticadas, como a imunoistoquímica, poderia detectar alguma diferença entre os grupos.

No presente estudo a apoptose foi avaliada, do ponto de vista molecular, analisando-se a expressão de dois genes: o Bax (pró-apoptótico) e o Bcl-XL (anti-apoptótico). A expressão do gene Bax foi significativamente maior no grupo LFS comparado com o controle e com o LFS+PCI 3 horas após a reperfusão. Esse dado reforça a hipótese de que na situação *large-for-size* a apoptose devido a lesão IR seja mais exacerbada. Além disso, o PCI conferiu um papel protetor diminuindo a expressão do gene Bax.

A expressão do gene anti-apoptótico Bcl-XL não apresentou diferença entre os grupos, porém com tendência a ser maior no grupo LFS+PCI após 3 horas da reperfusão. Nesse intervalo, a diferença entre os grupos LFS e LFS+PCI ficou próxima da significância estatística ($p=0,05$).

A análise da expressão da eNOS demonstrou que, 3 horas após a reperfusão, houve uma expressão significativamente maior desse gene no grupo LFS+PCI do que nos demais. Já é descrito que o PCI tem como consequência o aumento da

expressão da eNOS. Essa enzima é responsável pela produção de NO que por sua vez contribui com o equilíbrio microcirculatório, diminuindo a lesão tecidual³⁶.

A regeneração hepática foi avaliada pela expressão do gene da IL-6. Essa interleucina é liberada na fase aguda da lesão IR pela célula de Kupffer. Estudos prévios demonstraram o papel da IL-6 na regeneração hepática bem como a influência do PCI na produção dessa interleucina^{41,43}.

No presente estudo, não houve diferença entre os grupos na primeira hora após reperfusão. No entanto, no período seguinte, houve um significativo aumento na expressão desse gene no grupo LFS+PCI. Esse achado sugere que a IL-6, juntamente com outros fatores, deve estar envolvida nos mecanismos de proteção do PCI em atenuar a lesão de IR.

Em resumo, as variáveis estudadas demonstraram que a lesão de IR é mais acentuada na situação de transplante hepático *large-for-size* e é atenuada em algum grau pelo PCI.

Por se tratar de um estudo de fase aguda, esse trabalho tem como limitação a não avaliação das lesões a médio e longo prazo no modelo *large-for-size* do transplante hepático bem como análise de sobrevida do enxerto e do animal. Além disso, esse estudo não teve como objetivo a avaliação de possíveis distúrbios de fluxo sanguíneo hepático no modelo *large-for-size*.

Um estudo que mantivesse os animais vivos por mais tempo, apesar da dificuldade do ponto de vista legal e logístico, e que avaliasse a perfusão hepática e possíveis manobras para modificar esse fluxo seria importante para o melhor entendimento dos processos biológicos que estão envolvidos nesse cenário.

Dessa forma, a padronização de um modelo reprodutível de transplante hepático *large-for-size* em suínos e a criação de uma linha de pesquisa sobre o tema é fundamental para se tentar esclarecer as consequências dessa situação tão frequente e relevante na prática clínica.

6. Conclusões

Nas condições da presente pesquisa, pôde-se concluir que:

1. O modelo de transplante hepático *large-for-size* em suínos, utilizando-se animais doadores com massa aproximadamente duas vezes maior do que a do animal receptor, foi padronizado e pôde ser utilizado na pesquisa;
2. Utilizando-se métodos bioquímicos e moleculares, verificou-se que no cenário *large-for-size* a lesão de IR foi mais acentuada do que no grupo controle. A avaliação histológica pela coloração de HE não demonstrou diferença entre os grupos nos tempos estudados;
3. O PCI na situação *large-for-size* não minimizou a elevação das enzimas hepáticas no pós-operatório, porém promoveu aumento na expressão do gene de proliferação celular IL-6 e do gene eNOS. Além disso, provocou diminuição na expressão do gene pró-apoptótico Bax.

7. Anexos

Anexo A. Valores individuais dos pesos dos animais doadores (D) e receptores (R).

Grupos	Peso (Kg)				
Controle (D)	21	18,8	16,5	20	20
LFS (D)	40	42	53	39,4	50
LFS+PCI (D)	45,5	53	46,5	48,2	48
Controle (R)	20	19,8	20,5	21,8	22,2
LFS (R)	19	18	23	30	21
LFS+PCI (R)	17	21,2	21,5	24,5	19,2

Anexo B. Valores individuais das relações enxerto e peso dos animais receptores (GBWR).

Grupos	GBWR (%)				
Controle	2,8	2,9	3,2	2,6	3,0
LFS	6,1	5,9	5,8	6,1	7,6
LFS+PCI	7,7	7,2	5,7	5,6	5,8

Anexo C. Valores individuais dos tempos de isquemia total (T) e quente (Q) em minutos.

Grupos	Tempo (min)				
Controle (T)	136	150	125	120	163
LFS (T)	135	158	148	150	147
LFS+PCI (T)	167	163	149	151	130
Controle (Q)	46	40	43	45	50
LFS (Q)	45	45	48	45	51
LFS+PCI (Q)	48	43	52	45	47

Anexo D. Valores individuais da pressão arterial média (PAM) basal (mmHg).

Grupos	PAM (mmHg)			
Controle	85	90	88	83
LFS	74	94	90	70
LFS+PCI	80	87	77	88

Anexo E. Valores individuais da pressão arterial média (PAM) durante clampeamento da aorta (mmHg).

Grupos	PAM (mmHg)			
Controle	108	105	110	115
LFS	105	108	115	111
LFS+PCI	109	116	105	115

Anexo F. Valores individuais da pressão arterial média (PAM) 10 minutos após reperfusão (mmHg).

Grupos	PAM (mmHg)			
Controle	66	65	68	62
LFS	68	64	60	64
LFS+PCI	68	61	66	63

Anexo G. Valores individuais da pressão arterial média (PAM) 3 horas após reperfusão (mmHg).

Grupos	PAM (mmHg)			
Controle	67	63	70	65
LFS	67	68	65	70
LFS+PCI	65	68	63	70

Anexo H. Valores individuais da frequência cardíaca (FC) basal (bpm).

Grupos	FC (bpm)			
Controle	83	77	80	93
LFS	90	84	82	88
LFS+PCI	92	88	77	89

Anexo I. Valores individuais da frequência cardíaca (FC) durante clampeamento da aorta (bpm).

Grupos	FC (bpm)			
Controle	116	120	109	128
LFS	110	120	117	102
LFS+PCI	125	114	121	108

Anexo J. Valores individuais da frequência cardíaca (FC) 10 minutos após reperfusão (bpm).

Grupos	FC (bpm)			
Controle	128	140	130	122
LFS	112	111	140	132
LFS+PCI	107	143	115	125

Anexo K. Valores individuais da frequência cardíaca (FC) 3 horas após reperfusão (bpm).

Grupos	FC (bpm)			
Controle	132	130	120	140
LFS	140	130	136	138
LFS+PCI	115	130	140	136

Anexo L. Valores individuais das medidas de pH basal (b), 1 e 3 horas após reperfusão.

Grupos	pH				
Controle (b)	7,5	7,47	7,32	7,34	7,4
LFS (b)	7,45	7,46	7,44	7,38	7,43
LFS+PCI (b)	7,41	7,41	7,51	7,43	7,47
Controle (1h)	7,07	7,04	7,15	7,05	7,07
LFS (1h)	7,01	7,22	7,11	6,96	7,11
LFS+PCI (1h)	7,05	7,2	7,0	7,05	7,01
Controle (3h)	7,07	7,03	7,0	7,09	7,04
LFS (3h)	6,93	7,03	7,16	6,91	7,04
LFS+PCI (3h)	7,17	7,19	7,0	7,1	7,1

Anexo M. Valores individuais das dosagens séricas de sódio basal (b), 1 e 3 horas após reperfusão.

Grupos	Dosagem sérica (mEq/L)				
Controle (b)	140	137	136	139	138
LFS (b)	137	138	137	139	139
LFS+PCI (b)	136	135	137	140	138
Controle (1h)	144	138	141	142	141
LFS (1h)	135	137	136	139	136
LFS+PCI (1h)	139	129	135	138	140
Controle (3h)	144	139	144	142	142
LFS (3h)	135	138	142	138	138
LFS+PCI (3h)	138	138	141	136	148

Anexo N. Valores individuais das dosagens séricas de potássio basal (b), 1 e 3 horas após reperfusão.

Grupos	Dosagem sérica (mEq/L)				
Controle (b)	4,6	3,3	4,8	4,0	4,1
LFS (b)	4,6	4,4	4,0	3,8	4,3
LFS+PCI (b)	4,8	3,6	4,6	2,9	4,4
Controle (1h)	5,5	4,8	5,7	4,8	5,2
LFS (1h)	6,9	7,8	5,4	6,4	6,7
LFS+PCI (1h)	8,6	7,3	6,7	7,6	5,9
Controle (3h)	6,3	4,3	4,9	5,0	5,1
LFS (3h)	6,9	6,0	5,7	4,9	5,8
LFS+PCI (3h)	6,2	6,1	6,5	5,4	6,0

Anexo O. Valores individuais das dosagens séricas da AST 1 e 3 horas após a reperfusão.

Grupos	Dosagem sérica (U/L)				
Controle (1h)	370	129	494	317	378
LFS (1h)	988	1733	828	390	1068
LFS+PCI (1h)	2188	2385	1301	793	651
Controle (3h)	328	274	571	305	486
LFS (3h)	1577	2037	1040	425	1627
LFS+PCI (3h)	2079	1420	968	881	730

Anexo P. Valores individuais das dosagens séricas da ALT 1 e 3 horas após a reperfusão.

Grupos	Dosagem sérica (U/L)				
Controle (1h)	41	33	48	37	36
LFS (1h)	68	88	56	44	57
LFS+PCI (1h)	92	116	61	32	31
Controle (3h)	32	64	44	30	41
LFS (3h)	79	99	61	45	70
LFS+PCI (3h)	97	70	52	36	49

Anexo Q. Valores individuais dos escores atribuídos a necrose centrolobular 1 e 3 horas após reperfusão.

Grupos	Escore				
Controle (1h)	0	0	0	0	0
LFS (1h)	0	0	0	2	0
LFS+PCI (1h)	0	0	0	0	0
Controle (3h)	0	0	0	0	0
LFS (3h)	0	0	0	2	0
LFS+PCI (3h)	0	3	0	0	0

Anexo R. Valores individuais dos escores atribuídos a presença de neutrófilos no sinusóide 1 e 3 horas após reperfusão.

Grupos	Escore				
Controle (1h)	1	1	3	3	2
LFS (1h)	1	1	2	3	2
LFS+PCI (1h)	2	2	1	3	2
Controle (3h)	2	2	4	2	3
LFS (3h)	1	1	3	4	3
LFS+PCI (3h)	3	2	1	4	2

Anexo S. Valores individuais dos escores atribuídos a esteatose 1 e 3 horas após reperfusão.

Grupos	Escore				
Controle (1h)	1	3	2	0	0
LFS (1h)	1	0	0	0	0
LFS+PCI (1h)	0	1	0	0	0
Controle (3h)	1	0	0	0	0
LFS (3h)	0	0	0	0	0
LFS+PCI (3h)	0	1	0	0	0

Anexo T. Valores individuais dos escores atribuídos a presença de corpos apoptóticos 1 e 3 horas após reperfusão.

Grupos	Escore				
Controle (1h)	0	0	1	0	0
LFS (1h)	0	0	0	2	0
LFS+PCI (1h)	0	1	0	0	1
Controle (3h)	0	1	2	0	0
LFS (3h)	0	0	1	2	0
LFS+PCI (3h)	0	3	0	1	1

Anexo U. Valores individuais dos escores atribuídos a presença dilatação sinusoidal 1 e 3 horas após reperfusão.

Grupos	Escore				
Controle (1h)	2	1	1	2	0
LFS (1h)	1	1	1	0	2
LFS+PCI (1h)	1	2	2	1	2
Controle (3h)	3	1	1	1	0
LFS (3h)	2	1	2	0	2
LFS+PCI (3h)	1	1	2	1	2

Anexo V. Valores individuais das quantificações relativas do gene Bax 1 e 3 horas após a reperfusão.

Grupos	Quantificação relativa				
Controle (1h)	0,3	0,45	0,44	0,43	0,45
LFS (1h)	1,85	1,62	1,55	0,4	1,08
LFS+PCI (1h)	0,16	0,26	0,44	0,55	0,52
Controle (3h)	0,21	0,16	0,28	0,38	0,36
LFS (3h)	0,45	0,57	0,62	1,07	1,23
LFS+PCI (3h)	0,16	0,24	0,34	0,32	0,28

Anexo W. Valores individuais das quantificações relativas do gene eNOS 1 e 3 horas após a reperfusão.

Grupos	Quantificação relativa				
Controle (1h)	0,53	0,81	0,65	0,52	0,92
LFS (1h)	1,13	0,66	0,84	1,1	0,79
LFS+PCI (1h)	2,02	1,15	1,16	0,88	1,3
Controle (3h)	0,51	0,88	0,79	0,63	0,56
LFS (3h)	0,96	0,43	0,42	0,31	0,62
LFS+PCI (3h)	2,52	1,78	0,92	0,95	2,04

Anexo X. Valores individuais das quantificações relativas do gene Bcl-XL 1 e 3 horas após a reperfusão.

Grupos	Quantificação relativa				
Controle (1h)	0,43	2,6	2,1	1,06	3,1
LFS (1h)	1,02	1,28	1,45	1,54	0,64
LFS+PCI (1h)	1,12	1,71	1,26	1,05	1,02
Controle (3h)	0,41	0,99	1,85	0,83	0,73
LFS (3h)	0,79	0,49	0,83	0,69	0,44
LFS+PCI (3h)	1,11	1,18	2,39	0,65	0,99

Anexo Y. Valores individuais das quantificações relativas do gene IL-6 1 e 3 horas após a reperfusão.

Grupos	Quantificação relativa				
Controle (1h)	6,18	2,29	12,85	15,85	3,02
LFS (1h)	10,46	9,69	5,24	12,34	4,32
LFS+PCI (1h)	11,55	5,94	4,66	18,75	9,8
Controle (3h)	33,9	18,24	52,01	40,37	51,07
LFS (3h)	46,17	63,27	91,82	35,83	60,82
LFS+PCI (3h)	148,53	72,26	46,29	156,36	53,28

8. Referências

1. Tiao GM, Alonso MH, Ryckman FC. Pediatric liver transplantation. *Semin Pediatr Surg.* 2006;15:218-27.
2. Tannuri U, Velhote MC, Santos MM, Gibelli NE, Ayoub AA, Maksoud-Filho JG, Silva MM, Pinho ML, Miyatani HT, Maksoud JG. Pediatric liver transplantation: fourteen years of experience at the children institute in São Paulo, Brazil. *Transplant Proc.* 2004;36:941-2.
3. DeRusso PA, Ye W, Shepherd R, Haber BA, Shneider BL, Whittington PF, Schwarz KB, Bezerra JA, Rosenthal P, Karpen S, Squires RH, Magee JC, Robuck PR, Sokol RJ. Growth failure and outcomes in infants with biliary atresia: A report from the Biliary Atresia Research Consortium. *Hepatology.* 2007;46:1632-8.
4. Zamberlan P, Leone C, Tannuri U, Carvalho WB, Delgado AF. Nutritional risk and anthropometric evaluation in pediatric liver transplantation. *Clinics.* 2012;67:1387-92.
5. Noujaim HM, Mayer DA, Buckles JA, Beath SV, Kelly DA, McKiernan PJ, Mirza D de Ville de Goyet J. Techniques for and outcome of liver transplantation in neonates and infants weighing up to 5 kilograms. *J Pediatr Surg.* 2002;37:159-64.
6. Mekeel KL, Langham MR Jr, Gonzalez-Peralta RP, Hemming AW. Liver transplantation in very small infants. *Pediatr Transpl.* 2007;11:66-72.
7. Ogawa K, Kasahara M, Sakamoto S, Ito T, Taira K, Oike F, Ueda M, Egawa H, Takada Y, Uemoto S. Living donor liver transplantation with reduced monosegments for neonates and small infants. *Transplantation.* 2007;83:1337-40.

8. Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from live donors. *Lancet*. 1989;26:497.
9. Tannuri AC, Gibelli NE, Ricardi LR, Santos MM, Maksoud-Filho JG, Pinho-Apezato ML, Silva MM, Velhote MC, Ayoub AA, Andrade WC, Leal AJ, Miyatani HT, Tannuri U. Living related donor liver transplantation in children. *Transplant Proc*. 2011;43:161-4.
10. Kiuchi T, Kasahara M, Uryuhara K, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Egawa H, Fujita S, Hayashi M, Tanaka K. Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. *Transplantation*. 1999;67:321-7.
11. Moon JI, Kwon CH, Joh JW, Jung GO, Choi GS, Park JB, Kim JM, Shin M, Kim SJ, Lee SK. Safety of small-for-size grafts in adult-to-adult living donor liver transplantation using the right lobe. *Liver Transpl*. 2010;16:864-9.
12. Dahm F, Georgiev P, Clavien PA. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical applications. *Am J Transplant*. 2005;5:2605-10.
13. Ogura Y, Hori T, El Moghazy WM, Yoshizawa A, Oike F, Mori A, Kaido T, Takada Y, Uemoto S. Portal pressure <15mmHg is a key for successful adult living donor transplantation utilizing smaller grafts than before. *Liver Transpl*. 2010;16:718-28.
14. de Santibañes E, McCormack L, Mattera J, Pekolj J, Sívori J, Beskow A, D'Agostino D, Ciardullo M. Partial left lateral segment transplant from a living donor. *Liver Transpl*. 2000;6:108-12.

15. Kasahara M, Kaihara S, Oike F, Ito T, Fujimoto Y, Ogura Y, Ogawa K, Ueda M, Rela M, D Heaton N, Tanaka K. Living-donor liver transplantation with monosegments. *Transplantation*. 2003;27:694-6.
16. Enne M, Pacheco-Moreira L, Balbi E, Cerqueira A, Santalucia G, Martinho JM. Liver transplantation with monosegments. Technical aspects and outcome: a meta-analysis. *Liver Transpl*. 2005;11:564-9.
17. Teoh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection – the good, bad and deadly. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26:180-7.
18. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation*. 1992;53:957-78.
19. Varotti G, Grazi GL, Vetrone G, Ercolani G, Cescon M, Del Gaudio M, Ravaioli M, Cavallari A, Pinna A. Causes of early acute graft failure after liver transplantation: analysis of a 17-year-single-centre experience. *Clin Transplant*. 2005;19:492-500.
20. Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Ischemia and reperfusion in liver transplantation. *Transplant Proc*. 2005;37:1653-6.
21. Klune JR, Tsung A. Molecular biology of liver ischemia/reperfusion injury: established mechanisms and recent advancements. *Surg Clin North Am*. 2010;90:665-77.
22. de Rougemont O, Dutkowski P, Clavien PA. Biological modulation of liver ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15:183-9.

23. Gulbins E, Jekle A, Ferlinz K, Grassmé H, Lang F. Physiology of apoptosis. *Am J Renal Physiol.* 2000;279:605-15.
24. Li B, Chen B, Zhang G, Wang K, Zhou L, Hu S. Cell apoptosis and Fas gene expression in liver and renal tissues after ischemia-reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc.* 2010;42:1550-6.
25. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology.* 1998; 27:1652-60.
26. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation.* 1999;67:1099-105.
27. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. *Robbins and Contran Pathologic Basis of Disease.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005.
28. Hua C, Zorn S, Jensen JP, Coupland RW, Ko HS, Wright JJ, Bakhshi A. Consequence of the t(14;18) chromosomal translocation in follicular lymphoma: deregulated expression of a chimeric and mutated BCL-2 gene. *Oncogene Res.* 1988;2:263-75.
29. Junnarkar SP, Tapuria N, Mani A, Dijk S, Fuller B, Seifalian AM, Davidson BR. Attenuation of warm ischemia-reperfusion injury in the liver by bucillamine through decreased neutrophil activation an Bax/Bcl-2 modulation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25:1891-9.
30. Ben-Ari Z, Pappo O, Cheporko Y, Yasovich N, Offen D, Shainberg A, Leshem D, Sulkes J, Vidne BA, Hochhauser E. Bax ablation protects against hepatic

- ischemia/reperfusion injury un transgenic mice. *Liver Transpl.* 2007;13:1181-8.
31. Taki-Eldin A, Zhou L, Xie HY, Zheng SS. Liver regeneration after liver transplantation. *Eur Surg Res.* 2012; 48:139-53.
 32. Camargo CA Jr, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology.* 1997;26:1513-20.
 33. Debonera F, Aldeguer X, Shen X, Gelman AE, Gao F, Que X, Greenbaum LE, Furth EE, Taub R, Olthoff KM. Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation. *J Surg Res.* 2001;96:289-95.
 34. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg.* 2001;181:160-6.
 35. Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl.* 2003;9:1-11.
 36. Koti RS, Tsui J, Lobos E, Yang W, Seifalian AM, Davidson BR. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. *FASEB J.* 2005;19:1155-7.
 37. Yagnik GP, Takahashi Y, Tsoulfas G, Reid K, Murase N, Geller DA. Blockade of the L-arginine/NO synthase pathway worsens hepatic apoptosis and liver transplant preservation injury. *Hepatology.* 2002;36:573-81.
 38. ShiY, Rehman H, Wright GL, Zhong Z. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents graft injury after transplantation of livers from rats after cardiac death. *Liver Transpl.* 2010;16:1267-77.

39. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74:1124-36.
40. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg*. 2003;20:383-96.
41. Bedirli A, Kerem M, Pasaoglu H, Erdem O, Ofluoglu E, Sakrak O. Effects of ischemic preconditioning on regenerative capacity of hepatocyte in the ischemically damaged rat livers. *J Surg Res*. 2005;125:42-48.
42. Ishii S, Abe T, Saito T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M, Suzuki M, Motoki R, Gotoh M. Effects of preconditioning on ischemia/reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2001;8:461-8.
43. Kannerup AS, Gronbaek H, Funch-Jensen P, Tonnesen E, Jorgensen RL, Mortensen FV. Cytokine changes during warm ischemia and reperfusion of the pig liver with or without preconditioning. *Eur Surg Res*. 2009;42:216-22.
44. Saito T, Ishii S, Abe T, et al: Effect of preconditioning in the liver against ischemia/reperfusion injury, protection of sinusoidal cells and alterations of gene transcription. *Transplant Proc*. 2001;33:849.
45. Schulz R, Walz MK, Behrends M, Neumann T, Gerken G, Heusch G. Minimal protection of the liver by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:198-207.
46. Koneru B, Fisher A, He Y, Skurnick J, Wilson DJ, de la Torre AN, et al. Ischemic preconditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective

- randomized clinical trial of safety and efficacy. *Liver Transpl.* 2005;11:196-202.
47. Koneru B, Shareef A, Dikdan G, Desai K, Klein KM, Peng B, et al. The ischemic preconditioning paradox in deceased donor liver transplantation-evidence from a prospective randomized single blind clinical trial. *Am J Transplant.* 2007;7:2788-96.
48. Adeyi O, Fischer SE, Guindi M. Liver allograft pathology: approach to interpretation of needle biopsies with clinicopathological correlation. *J Clin Pathol.* 2010; 63:47-74.
49. Ekser B, Gridelli B, Cooper DK. Porcine alanine transaminase after liver allo- and xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2012;19:52-5.
50. Kashfi A, Mehrabi A, Pahlavan PS, Schemmer P, Gutt CN, Friess H, Gebhard MM, Schmidt J, Büchler MW, Kraus TW. A review of various techniques of orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplant Proc.* 2005;37:185-8.
51. Isman H, Brisard M, Lupo B, Caubet M, Derck MY, Bottero R. La greffe orthotopique du foie sous clampage aortique. *J Chir (Paris).* 1982;119:65-71.
52. Oike F, Uryuhara K, Otsuka M, Dehoux JP, Otte JB, Lerut J, Gianello P. Simplified technique of orthotopic liver transplantation in pigs. *Transplantation.* 2001;71:328-31.
53. Abu-Amara M, Yang SY, Quaglia A, Rowley P, Fuller B, Seifalian A, Davidson B. Role of endothelial nitric oxide synthase in remote ischemic preconditioning of the mouse liver. *Liver Transpl.* 2011;17:610-9.

54. Hamada T, Fondevila C, Busuttil RW, Coito AJ. Metalloproteinase-9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2008;47:186-198.
55. Hara H, Gridelli B, Lin YJ, Marcos A, Cooper DK. Liver Xenografts for the treatment of acute liver failure: clinical and experimental experience and remaining immunologic barriers. *Liver Transpl*. 2008;14:425-34.
56. Fukueda M, Ishizaki N, Hamada N, Kadono J, Kaieda M, Nakamura N, Komokata T, Sakata R. Porcine model of auxiliary partial orthotopic liver transplantation for acute liver failure. *Transplantation*. 2006;82:1312-8.
57. Peng CH, Shi LB, Zhang HW, Peng SY, Zhou GW, Li HW. Establishment of a new pig model for auxiliary partial orthotopic liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2005;11:917-21.
58. Fung J, Rao A, Starzl T. Clinical trials and projected future of liver xenotransplantation. *World J Surg*. 1997;21:956-61.
59. Calne RY, Yoffa DE, White HJO, Maginn RR. A technique of orthotopic liver transplantation in the pig. *Br J Surg*. 1968; 55: 203
60. Terblanche J, Peacock JH, Bowes J, Hobbs KEF. The technique of orthotopic liver homotransplantation in the pig. *J Surg Res*. 1968; 8: 151.
61. Heuer M, Reinhardt R, Kneiseler G, Würzinger P, Xou X, Hua F, Jian F, Paul A, Kaiser GM. Liver transplantation in swine without venovenous bypass. *Eur Surg Res*. 2010;45:20-5.
62. López-Santamaria M, Migliazza L, Gamez M, Murcia J, Paz Cruz JA, Muñoz J, Canser E, Qi B, Lobato R, Diaz M, Tovar JA. Supraceliac aortic clamping

- during the anhepatic phase of experimental orthotopic liver transplantation. *J Pediatr Surg*. 1999;34:1374-7.
63. Leng JJ, Dong JH, Han BL. Experimental study on mechanism of graft injury of small-for-size liver transplantation in miniature pigs. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009;89:1525-8.
64. Fondevila C, Hessheimer AJ, Taurá P, Sánchez O, Calatayud D, de Riva N, Muñoz J, Fuster J, Rimola A, García-Valdecasas JC. Portal hyperperfusion: mechanism of injury and stimulus for regeneration in porcine small-for-size transplantation. *Liver Transpl*. 2010;16:364-74.
65. Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA). Princípios éticos para o uso de animais de laboratório. Disponível em <http://www.cobea.org.br>.
66. Cruz RJ Jr, de Figueiredo LF, Braz JL, Diniz EA, Rocha e Silva M. Systemic and regional effects of supraceliac aortic occlusion during experimental hepatic vascular exclusion. *Am J Surg*. 2003;185:388-93.
67. Maksoud JG, Chapchap P, Porta G, Miura I, Carone-Filho E, Tannuri U, Silva MM, Ayoub AA, Santos MM, Fauza DO, Faria L, Figueiredo AD, Leite JA, Benitez PR, Lopes EM, Zerbini MC, Viana R, Gayotto, LC, Magalhães-Filho A. Transplante de fígado em crianças: experiência inicial do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. *AMB Rev Assoc Med Bras*. 1991;37:193-9.
68. Schulze M, Dresske B, Deinzer J, Braun F, Kohl M, Schulz-Jürgensen S, Borggrefe J, Burdelski M, Bröring DC. 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? *Transpl Int*. 2011;24:797-804.

-
69. Hill MJ, Hughes M, Jie T, Cohen M, Lake J, Payne WD, Humar A. Graft weight/recipient weight ratio: how well does it predict outcome after partial liver transplants. *Liver Transpl.* 2009;15:1056-62.
 70. Gelman S. The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. *Anesthesiology.* 1995;82:1026-60.
 71. Ricciardi R, Schaffer BK, Kim RD, Shah SA, Donohue SE, Wheeler SM, Quarfordt SH, Callery MP, Meyers WC, Chari RS. Protective effects of ischemic preconditioning on the cold-preserved liver are tyrosine kinase dependent. *Transplantation.* 2001;72:406-12.
 72. Borland LM, Roule M, Cook DR. Anesthesia for Pediatric Orthotopic Liver Transplantation. *Anesth Analg.* 1985;64:117-24.
 73. Carmichael FJ, Lindop MJ, Farman JV. Anesthesia for Hepatic Transplantation: Cardiovascular and Metabolic Alterations and their Management. *Anesth Analg.* 1985;64:108-16.
 74. Ginès P, Berl T, Bernardi M, Bichet DG, Hamon G, Jiménez W, Liard JF, Martin PY, Schrier RW. Hyponatremia in cirrhosis: from pathogenesis to treatment. *Hepatology.* 1998;28:851-64.
 75. Abbasoglu O, Goldstein RM, Vodapally MS, Jennings LW, Levy MF, Husberg BS, Klintmalm GB. Liver transplantation in hyponatremic patients with emphasis on central pontine myelinolysis. *Clin Transplant.* 1998;12:263-69.
 76. Yu J, Zheng SS, Liang TB, Shen Y, Wang WL, Ke QH. Possible causes of central pontine myelinolysis after liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2004;10:254-43.

-
77. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988;45:673-76.
 78. Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning. Effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc*. 1993;25:3303-3304.
 79. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: Role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology*. 1997;25:934-937.
 80. Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Hotter G. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology*. 1998;28:768-73.
 81. Zapletal C, Maksan SM, Lehmann T, Guenther L, Fallsehr C, Mehrabi A, Weiss G, Golling M, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Ischemic preconditioning improves liver microcirculation after ischemia/reperfusion. *Transplant Proc*. 1999;31:3260-62.
 82. Koti RS, Yang W, Dashwood MR, Davidson BR, Seifalian AM. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transpl*. 2002;8:1182-91.
 83. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology*. 1999;30:1223-31.

-
84. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Involvement of Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells in ischemic preconditioning to rat livers stored for transplantation. *Transplant Proc.* 1999;31:425-7.
 85. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A(2) receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury in rat livers. *Hepatology.* 2000;32:297-302.
 86. Sindram D, Rudiger HA, Upadhyia AG, Strasberg SM, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *J Hepatol.* 2002;36:78–84.
 87. Compagnon P, Lindell S, Ametani MS, Gilligan B, Wang HB, D'Alessandro AM, Southard JH, Mangino MJ. Ischemic preconditioning and liver tolerance to warm or cold ischemia: experimental studies in large animals. *Transplantation.* 2005;79:1393-400.
 88. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg.* 2000;232:155-62.
 89. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg.* 2003;238:843850; discussion 51-2.