BERNARDO FERNANDES CANEDO

**Autotransplante de fígado em suínos sem o uso de circulação extracorpórea:
modelo simplificado utilizando o clampeamento da aorta supracelíaca**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Programa de Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique
Ferreira Galvão

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Canedo, Bernardo Fernandes

Autotransplante de fígado em suínos sem o uso de
circulação extracorpórea : modelo simplificado
utilizando o clampeamento da aorta supracelíaca /
Bernardo Fernandes Canedo. -- São Paulo, 2019.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Flávio Henrique Ferreira Galvão.

Descritores: 1.Transplante de fígado
2.Transplante autólogo 3.Modelos animais
4.Suínos/cirurgia 5.Treinamento por simulação
6.Procedimentos cirúrgicos do sistema
digestório/métodos 7.Clampeamento da aorta
supracelíaca

USP/FM/DBD-111/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta conquista à minha família, fonte ininterrupta de amor e inspiração.
Exemplo de seres humanos e profissionais que todos são.

Ao meu pai, **Papito (Jorge)**, pelo incentivo constante e por compartilhar sua imensa sabedoria de vida pessoal e médica.

À minha mãe, **Mamita (Onsly)**, minha cúmplice, por ter sempre sido minha fonte de aconchego não importando o momento e a circunstância.

Aos meus irmãos, **Alexandre e Leonardo**, que, como irmãos mais velhos, sempre estimularam e orientaram este caçula a superar os desafios da vida.

À minha cunhada, **Paula**, e aos meus sobrinhos, **Jorge, Guilherme, Luiza e Henrique**, pela alegria que me proporcionam em ver nossa família crescer e frutificar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Luiz Carneiro D'Albuquerque, chefe agregador, exemplo de liderança e de médico cirurgião. Meus sinceros agradecimentos pelos valiosos ensinamentos e orientações na vida pessoal e profissional. Pela confiança depositada e oportunidades proporcionadas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio Henrique Galvão, mestre e amigo. De entusiasmo contagiante em pesquisa experimental, em um país onde ela ainda é pouco valorizada e realizada com muita dificuldade, agradeço pelo enorme aprendizado neste ofício.

Ao Prof. Dr. Wellington Andraus, pessoa e profissional admirável. Um grande amigo, sempre disponível e solidário. Mentor, com quem muito aprendi a arte da cirurgia, dentro e fora do campo operatório.

Aos queridos amigos doutores do Serviço de Transplante de Órgãos do Aparelho Digestivo, com quem tive a enorme felicidade e satisfação de conviver, aprender e trabalhar: Dra. Liliana Ducatti, Dr. Rodrigo Bronze, Dr. Vinícius Rocha Santos, Dr. Lucas Nacif, Dr. Rubens Arantes, Dr. Rafael Pinheiro, Dra. Luciana Haddad e Dra. Alice Song. Sou muito grato por ter participado desta equipe e por serem sempre tão receptivos e atenciosos quando por mim solicitados, mesmo à distância, no dia-a-dia profissional.

À toda equipe do Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Transplante de Órgãos do Aparelho Digestivo (LIM-37), em especial Amadeo Neto, Genilton Mesquita, Roberto Senna, Jose Victor Cartem, Caroline Faria e Valcinéia Gaspar, pela ajuda e gratificante convívio.

Aos residentes e estagiários do Serviço de Transplante de Órgãos do Aparelho Digestivo, que foram fundamentais na execução dos experimentos.

Ao colega patologista, Dr. Anderson Costa Lino, pela disponibilidade e colaboração na análise histopatológica.

A Ricardo Castro Lopes, querido amigo e compadre, pelo auxílio na correção ortográfica desta tese.

À minha companheira, Hegle Marinho, pelo amor e compreensão na sempre turbulenta fase final de uma defesa de doutorado.

“Você vê coisas e diz: por que? Mas eu sonho com coisas que nunca existiram e
pergunto: por que não?”
(George Bernard Shaw)

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	8
3. MÉTODOS.....	10
3.1. Delineamento Experimental.....	10
3.2. Amostra.....	11
3.3. Procedimento Anestésico.....	13
3.4. Padronização do Procedimento Cirúrgico.....	14
3.4.1. Incisão.....	15
3.4.2. Dissecção.....	16
3.4.3. Hepatectomia total e Cirurgia de Bancada.....	22
3.4.4. Implante.....	23
3.4.5. Fechamento.....	25
3.5. Análise Laboratorial.....	25
3.6. Análise Histopatológica.....	26
3.7. Análise Estatística.....	26
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Análise do Procedimento Cirúrgico.....	28
4.2. Análise dos Parâmetros Hemodinâmicos.....	28
4.3. Análise Laboratorial.....	31
4.3.1. Análise Metabólica.....	31
4.3.2. Análise das Enzimas Hepáticas.....	35
4.4. Análise Histopatológica.....	38
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÃO.....	49

7. ANEXOS.....	51
7.1. Anexo A – Ficha de Cirurgia.....	51
7.2. Anexo B – Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	52
7.3. Anexo C – Base de Dados.....	53
8. REFERÊNCIAS.....	61

Apêndice

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

5PR	Terceiro tempo da coleta de dados, cinco minutos após reperfusão do fígado
ALT	Aminotransferase de alanina
AST	Aminotransferase de aspartato
AXC	Segundo tempo da coleta de dados, durante o clampeamento da aorta supracelíaca, anterior a reperfusão do fígado
B	Primeiro tempo da coleta de dados, após indução anestésica (basal)
BE	<i>Base excess</i>
BT	Bilirrubina total
CEUA	Comissão de Ética no Uso dos Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
dl	Decilitro
et al.	e outros
EtCO ₂	Concentração final expiratória de dióxido de carbono
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fosfatase alcalina
FC	Frequência cardíaca
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Fr	French
GE	Grupo experimento
GGT	Gamaglutamiltransferase
h	Hora
HCO ₃	Bicarbonato
K	Potássio
kg	Quilograma
l	Litro
mg	Miligrama
min	Minutos
ml	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
NS	Não significativa
PaCO ₂	Pressão arterial do dióxido de carbono

PAM	Pressão arterial média
PVC	Pressão venosa central
SH	Grupo controle (SHAM)
T	Quarto tempo da coleta de dados, imediatamente anterior à eutanásia do animal
VCI	Veia cava inferior
µg	Micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Modelo experimental de transplante hepático desenvolvido por Staudacher descrito em 1952.....	2
Figura 2 –	Transplante hepático auxiliar em cães (procedimento de Welch).....	2
Figura 3 –	Descompressão dos leitos portal e veia cava inferior em modelo de transplante ortotópico de fígado em cães.....	3
Figura 4 –	Organograma representativo do delineamento do estudo.....	11
Figura 5 –	Centro cirúrgico para procedimentos em animais de grande porte do Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Órgãos do Aparelho Digestivo da FMUSP (LIM 37).....	13
Figura 6 –	Representação da abertura da cavidade.....	15
Figura 7 –	Hilo hepático: início da dissecação.....	16
Figura 8 –	Início da dissecação do ligamento hepatogástrico.....	17
Figura 9 –	Término da dissecação do ligamento hepatogástrico.....	18
Figura 10 –	Hilo hepático: aspecto final da dissecação.....	19
Figura 11 –	Descolamento do pâncreas da face anterior da veia cava inferior infra-hepática.....	20
Figura 12 –	Dissecação da veia cava inferior supra-hepática.....	21
Figura 13 –	Dissecação da aorta supracelíaca.....	22
Figura 14 –	Secção da veia cava inferior supra-hepática.....	23
Figura 15 –	Aspecto final das anastomoses vasculares.....	24
Figura 16 –	Micrografia do fígado do grupo experimento (Hematoxilina-Eosina, 100x).....	39
Figura 17 –	Micrografia do fígado do grupo experimento (Hematoxilina-Eosina, 400x).....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Unidades de medida utilizadas na expressão dos resultados laboratoriais.....	25
Tabela 2 – Tempo médio e desvio padrão para confecção das anastomoses vasculares e biliar (em minutos).....	28
Tabela 3 – Média e desvio padrão das variáveis hemodinâmicas do grupo experimento nos diferentes tempos.....	29
Tabela 4 – Média e desvio padrão das variáveis metabólicas do grupo experimento nos diferentes tempos.....	32
Tabela 5 – Média e desvio padrão das enzimas hepáticas do grupo experimento nos diferentes tempos.....	35
Tabela 6 – Análise dos achados histopatológicos.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Box-plot representativo da frequência cardíaca nos grupos experimento e controle.....	29
Gráfico 2 –	Box-plot representativo da pressão arterial média nos grupos experimento e controle.....	30
Gráfico 3 –	Box-plot representativo da pressão venosa central nos grupos experimento e controle.....	30
Gráfico 4 –	Box-plot representativo da concentração expiratória final de dióxido de carbono nos grupos experimento e controle.....	31
Gráfico 5 –	Box-plot representativo do pH nos grupos experimento e controle.....	32
Gráfico 6 –	Box-plot representativo da pressão arterial de dióxido de carbono.....	33
Gráfico 7 –	Box-plot representativo do nível de bicarbonato nos grupos experimento e controle.....	33
Gráfico 8 –	Box-plot representativo do nível do <i>base excess</i> nos grupos experimento e controle.....	34
Gráfico 9 –	Box-plot representativo do nível de lactato nos grupos experimento e controle.....	34
Gráfico 10 –	Box-plot representativo do nível de potássio nos grupos experimento e controle.....	35
Gráfico 11 –	Box-plot representativo da bilirrubina total nos grupos experimento e controle.....	36
Gráfico 12 –	Box-plot representativo da aminotransferase de aspartato nos grupos experimento e controle.....	36
Gráfico 13 –	Box-plot representativo da aminotransferase de alanina nos grupos experimento e controle.....	37
Gráfico 14 –	Box-plot representativo da fosfatase alcalina nos grupos experimento e controle.....	37

Gráfico 15 – Box-plot representativo da gamaglutamiltransferase nos grupos experimento e controle.....	38
---	----

RESUMO

Canedo BF. *Autotransplante de fígado em suínos sem o uso de circulação extracorpórea: modelo simplificado utilizando o clampeamento da aorta supracelíaca [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: Modelos experimentais em suíno são essenciais para pesquisa e treinamento em transplante de fígado. No entanto, este animal apresenta instabilidade hemodinâmica grave durante a fase anepática, exigindo um curto período anepático (não apropriado para fins de treinamento) ou o uso de circulação extracorpórea (que está associado a significativas complicações intra-operatórias). Além disso, a maioria dos modelos em suíno é alogênico, o que não é nem eticamente nem economicamente adequado para treinamento cirúrgico. **Objetivo:** Desenvolver e testar um modelo de autotransplante hepático em suínos sem o uso de circulação extracorpórea. **Métodos:** Onze porcos da raça *Sus domesticus* foram submetidos a cirurgia simulada (SHAM; n = 3) ou autotransplante de fígado (grupo experimental (GE); n = 8) sem o uso de circulação extracorpórea. Após a realização de uma incisão em “J”, o hilo hepático foi inteiramente dissecado abaixo do nível da artéria gastroduodenal e o fígado completamente mobilizado. A aorta supracelíaca foi então dissecada através do pilar esquerdo do diafragma. Nenhuma outra etapa foi realizada no grupo SHAM. No GE, a partir de então, procedeu-se o autotransplante ortotópico de fígado empregando-se a técnica convencional com duas anastomoses de veia cava, semelhante à técnica clássica utilizada na prática clínica. Durante a fase anepática, foi utilizando o clampeamento da aorta supracelíaca a fim de manter a estabilidade hemodinâmica e evitar o uso do *by-pass*. Os animais foram submetidos a eutanásia 1h após o término do procedimento cirúrgico. Parâmetros hemodinâmicos e exames laboratoriais foram sistematicamente coletados em 4 tempos distintos: basal, pré-reperusão, 5min após reperusão e ao término do experimento. Foi realizada a análise histopatológica do enxerto após a reperusão. A análise estatística foi feita comparando amostras relacionadas, no GE, e duas amostras independentes, entre os grupos. **Resultados:** Empregando a técnica por nós padronizada, obteve-se 100% de sobrevida dos animais, todos estáveis hemodinamicamente. Os tempos médios de observação pós-reperusão e anepático foram de $136 \pm 12,50$ min e $47,88 \pm 8,03$ min, respectivamente. Não houve diferença estatística na pressão arterial média (PAM) entre o início e término do experimento no GE, nem entre os grupos durante a fase anepática. Ao término do experimento, a PAM foi significativamente maior no grupo SHAM quando comparado ao GE. A análise comparativa dos exames laboratoriais entre os grupos demonstrou que o pH, o bicarbonato e o *base excess* foram significativamente inferiores no GE 5min após a reperusão e ao término do experimento. O lactato mostrou-se ser significativamente inferior ao término do experimento no grupo SHAM. **Conclusão:** De acordo com os métodos utilizados no presente estudo, desenvolveu-se um modelo de autotransplante de fígado em suínos sem a utilização de mecanismo de circulação extracorpórea. Para tanto, utilizou-se o clampeamento da aorta supracelíaca durante o período anepático. O modelo proposto é factível por cirurgias em treinamento e com baixa mortalidade.

Descritores: Transplante de fígado; Transplante autólogo; Modelos animais; Suínos/cirurgia; Treinamento por simulação; Procedimentos cirúrgicos do sistema digestório/métodos; Clampeamento da aorta supracelíaca.

ABSTRACT

Canedo, BF. *Liver autotransplantation in pigs without venovenous bypass: a simplified model using supraceliac aorta cross-clamping maneuver [thesis]*. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Background: Experimental swine models have been essential for liver transplantation research and training. However, it experiences severe hemodynamic instability during the anhepatic phase, requiring either a short anhepatic phase (not appropriate for training purposes) or an extracorporeal circulation (which is linked to significant intraoperative complications). Furthermore, most of swine models are allograft ones, which is neither ethically nor financially suitable for surgical training. **Objective:** To develop and test a liver autotransplantation model in pig without venovenous bypass. **Methods:** Eleven *Sus domesticus* pigs underwent either sham surgery (SHAM group; n=3) or liver autotransplantation without venovenous bypass (experimental group (GE); n=8) by resident or fellow from Digestive Organs Transplant Division. After performing a right-sided J-shaped incision, hepatic hilum was entirely dissected under the level of the gastroduodenal artery and liver completely mobilized. Supraceliac aorta was then dissected through the diaphragm's left crus. No further step was performed in SHAM group. In the GE, thereafter, a liver autotransplantation was performed applying conventional bicaval anastomosis technique, similar to the classic technique used in clinical setting. During anhepatic phase, supraceliac aorta cross-clamping maneuver was carried out to sustain hemodynamic stability and avoid venovenous bypass. Animals underwent euthanasia one hour after the end of surgical procedure. Hemodynamic variables and blood samples were systematically collected at 4 different times: baseline, pre-reperfusion, 5min after reperfusion and at the end of experiment. Histological analysis of the graft was performed after reperfusion. Statistical analysis was accomplished comparing related samples in the GE and two independent samples between groups. **Results:** Applying the technique standardized by us, 100% survival was accomplished, all the animals hemodynamically stable. The mean post-reperfusion observation and anhepatic phase times were 136 ± 12.50 min and 48.38 ± 7.80 min, respectively. There was no statistical difference in mean arterial pressure (MAP) between baseline and the end of the experiment time in the GE, nor between the groups during the anhepatic phase. At the end of the experiment, MAP was significantly higher in the SHAM group compared to the experiment group. Blood samples statistical analysis between groups showed that pH, bicarbonate and base excess were significantly lower at 5 min post-reperfusion time and at the end of the experiment in the GE. The lactate was shown to be significantly lower in the SHAM group at the end of the experiment. **Conclusion:** According to the methods applied in the present study, a model of liver autotransplantation in swine was developed without the use of an extracorporeal circulation mechanism. For this purpose, supraceliac aortic cross-clamping maneuver was carried out during the anhepatic phase. The advocated model is feasible for training purpose with low mortality.

Descriptors: Liver transplantation; Transplantation, autologous; Models, animal; Swine/surgery; Simulation training; Digestive system surgical procedures/methods; Supraceliac aorta cross-clamping.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Globalmente, a cirrose hepática foi estimada como responsável por mais de um milhão de mortes em 2010, o equivalente a aproximadamente 2% de todas as mortes no mundo, além de um milhão por câncer de fígado e hepatite aguda¹. Em 2013, vinte e nove milhões de pessoas na Europa sofriam de doença crônica do fígado². O transplante de fígado é, desde 1983, o tratamento de escolha para as inúmeras causas de doença terminal do fígado³. Por tratar-se de um procedimento de alta complexidade, exige de quem deseja executá-lo um exercício intenso para aprendizado e padronização^{4,5}. Para tal, os modelos experimentais em animais de grande porte foram, e ainda são, determinantes para o desenvolvimento, aperfeiçoamento e treinamento da técnica, além da pesquisa⁶⁻⁹. Ainda assim, modelos simples e reprodutíveis de autotransplante, eticamente ideais neste contexto e cientificamente úteis no cenário em que a rejeição não é desejada, são escassos na literatura.

O primeiro modelo de transplante hepático em animal de grande porte descrito no mundo deve-se a Vittorio Staudacher da Universidade de Milão, Itália, apesar deste pioneirismo só ter sido reconhecido em 2012¹⁰. Vittorio publicou em 1952 uma série de experimentos com descrição detalhada da técnica de transplante ortotópico de fígado alogênico em cães (Figura 1)¹¹. Anterior a esta descoberta histórica, o pioneirismo era creditado a C. Stuart Welch, então professor da *Albany Medical College*, no estado de Nova Iorque, que em 1955 descreveu o transplante auxiliar de fígado total (heterotópico) (Figura 2) e a Jack Cannon, então professor da Universidade da Califórnia, Los Angeles, que em 1956 publicou sem muitos detalhes um modelo de transplante ortotópico de fígado; ambos em cães^{12,13}.

Figura 1 - Modelo experimental de transplante hepático desenvolvido por Staudacher descrito em 1952¹⁰. Embora as hepatectomias do receptor e do doador tenham sido realizadas de uma forma bastante semelhante à técnica convencional atual, o procedimento diferia consideravelmente em alguns aspectos no implante do órgão. Como exemplo, a artéria hepática do receptor não foi usada para articularizar diretamente o enxerto, e sim a veia porta.

FONTE: Busuttil RW, 2012.

Figura 2 - Transplante hepático auxiliar em cães (procedimento de Welch)¹². Nota-se que o influxo venoso portal do fígado transplantado era estabelecido através da anastomose entre a veia porta do enxerto e a veia ilíaca comum esquerda do receptor, enquanto o fígado nativo mantinha um suprimento de sangue normal. Para Starzl, tratava-se de uma falha importante na concepção do procedimento visto que privava o aloenxerto do fluxo portal.

FONTE: Welch CS, 1955.

Todavia, é indiscutível e universalmente aceito que o transplante de fígado, como é conhecido atualmente, não existiria sem os estudos de Thomas Starzl^{6,8}. Entre 1958-1961, Starzl desenvolveu e publicou detalhadamente modelos de hepatectomia total e substituição ortotópica do fígado em cães¹⁴⁻¹⁷. Concomitantemente e independentemente, Francis D. Moore iniciou em 1958 no Hospital Peter Bent Brigham, da Universidade de Harvard, em Boston, o programa de transplante de fígado experimental também em cães, mesmo ano do primeiro experimento bem sucedido de Starzl, então recém chegado a *Northwestern University*, em Chicago^{18,19}.

Em 1960, quando Moore e Starzl se conheceram no encontro anual da Associação Americana de Cirurgiões, eles tinham uma experiência acumulada de 111 transplantes de fígado em cães: 31 em Boston e 80 em Chicago⁶. O modelo mais utilizado por ambos era semelhante e consistia no alotransplante ortotópico utilizando *by-pass* venoso extracorpóreo passivo (Figura 3), essencial no entendimento da época para a sobrevivência do animal submetido à exclusão vascular do fígado^{15,18,20,21}. Contudo, o cão não parecia ser o animal mais adequado para modelo experimental de transplante hepático devido à presença de esfíncter muscular na confluência das veias hepáticas, o que o torna susceptível a bloqueio de efluxo^{22,23}.

Figura 3 - Descompressão dos leitos portal e veia cava inferior em modelo de transplante ortotópico de fígado em cães. Em (A), representação do *by-pass* extracorpóreo passivo único entre a veia femoral e a veia jugular interna após *shunt* portacava preliminar do modelo desenvolvido por Starzl¹⁵. Em (B), representação do modelo desenvolvido por Moore, que utilizava *shunts* externos passivos para descompressão individual dos dois sistemas venosos¹⁸.

FONTE: (A) Kaupp HAJ, 1960. (B) Moore FD, 1959.

Os modelos experimentais de transplante hepático em suíno tiveram início com Garnier (Paris, 1965)²⁴, Cordier (Paris, 1966)²⁵, Calne (Cambridge, 1967)²⁶, Mieny (Joanesburgo, 1967)²⁷ e Terblanche (Bistol, 1967)²⁸ e respectivos colaboradores. Outras vantagens deste animal em relação ao cão, além da ausência de esfíncter muscular ao nível das veias hepáticas, logo foram identificadas: 1) menor custo e comoção social^{29,30}; 2) maior semelhança anatômica e fisiológica com fígado humano³¹⁻³³ e principalmente; 3) melhor tolerância imunológica – menor rejeição aguda – sem uso de imunossupressores^{24,26,28,29,34-36}. Os modelos inicialmente descritos em suínos foram transpostos dos modelos caninos, caracterizados desta forma em modelos de transplante ortotópico alogênico com uso de circulação extracorpórea^{26,29,35-39}.

Durante muito tempo, a circulação extracorpórea foi vista como indispensável no modelo suíno de transplante hepático devido a: 1) trajetória intraparenquimatosa da veia cava inferior (VCI) ao nível do fígado, o que impede sua dissecação inviabilizando a técnica de “piggy-back”; 2) a escassez de *shunts* portosistêmicos espontâneos e ausência da veia ázigos^{38,40}. Quando submetido à exclusão vascular hepática e, por conseguinte, privação completa do retorno venoso dos sistemas portal e caval, o animal apresenta importante instabilidade hemodinâmica representada por diminuição de 50-60% da pressão sistólica e até 66% do débito cardíaco^{30,41}. A desvantagem é que a circulação extracorpórea torna o procedimento mais complexo e aumenta o risco de complicação intraoperatória iatrogênica^{24,26,30,37,38,42}.

A mortalidade intraoperatória relacionada à circulação extracorpórea em modelo de transplante ortotópico de fígado em animal de grande porte varia entre 7,1% e 33,3%^{26,27,29,42}. Dentre as causas mais importantes estão: sangramento, embolia gasosa e coagulação do sistema. Guiney et al.³⁴ foram os primeiros na literatura a relatar, em 1974, um modelo de transplante de fígado alogênico em suínos sem o uso de circulação extracorpórea. Porém, com uma mortalidade do experimento de 23%, sendo 46,2% relacionado à instabilidade hemodinâmica do período anepático, os autores concluíram ser necessário o mecanismo para o sucesso do modelo.

Pouquíssimos são os trabalhos existentes na literatura que demonstram ser viável a realização do transplante hepático alogênico em suínos sem o uso de circulação extracorpórea e manobras auxiliares. Oike et al. foram os primeiros a relatarem a viabilidade de tal modelo, em 2001, seguidos por Heuer, Fondevila e respectivos colaboradores^{30,43,44}. Estes únicos três trabalhos descritivos existentes na língua inglesa

concluem e enfatizam que, para o sucesso deste tipo de modelo, é indispensável uma equipe anestésica e cirúrgica bem treinada e sincronizada, pois o período anepático não deve ser superior a 20-30 minutos. Ressalta-se que no contexto de treinamento cirúrgico, este modelo é dificilmente reproduzível com esta mesma rapidez.

A fim de eliminar os problemas relacionados à circulação extracorpórea e manter estabilidade hemodinâmica durante a fase anepática, Goto⁴⁵ descreveu, em 1988, um modelo alogênico em suíno utilizando o clampeamento temporário da aorta supracelíaca. Neste estudo, ao comparar este modelo com um similar utilizando circulação extracorpórea, o autor obteve sobrevida em 24h semelhante entre os dois grupos. Concluiu então que o modelo sem circulação extracorpórea é mais simples, facilmente reproduzível e igualmente eficiente. Em 1999, López-Santamaria et al.⁴¹ estudaram as alterações hemodinâmicas em modelo semelhante. Os autores não identificaram diferença estatística significativa dos parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial média e débito cardíaco antes, durante e após o período anepático, demonstrando a eficácia do clampeamento da aorta supracelíaca na prevenção da instabilidade hemodinâmica em suínos. Leal et al.⁴⁶ em modelo experimental alogênico de “large-for-size”, constataram igualmente a boa tolerância hemodinâmica durante o período anepático com o uso desta manobra.

Inúmeros estudos na literatura atestam que o treinamento cirúrgico em modelo animal melhora a habilidade técnica e a competência cirúrgica quando os procedimentos são subsequentemente realizados em humanos, diminuindo assim a curva de aprendizado^{5,47-50}. A vantagem deste tipo de treinamento, considerado simulador de alta fidelidade, consiste em mimetizar a prática clínica – não somente as etapas cirúrgicas em si, mas também evitar e contornar as complicações intraoperatórias - em um ambiente de baixa tensão, onde erros são permissíveis. Além disso, permite aprimorar o trabalho em equipe entre cirurgião, anestesista, enfermeiro e perfusionista, essencial no contexto do transplante de órgãos sólidos^{4,50,51}. Os inconvenientes são o custo, a disponibilidade limitada e as preocupações morais e éticas. Na conjuntura do transplante de fígado, tais desvantagens podem ser atenuadas com a aplicação do modelo de autotransplante.

Para fins de treinamento cirúrgico em transplante de fígado, o modelo alogênico parece ser inadequado financeiramente e eticamente quando comparado ao modelo de autotransplante, pois torna o procedimento anestésico-cirúrgico mais oneroso e utiliza invariavelmente dois animais, sendo um obrigatoriamente sempre sacrificado.

Infelizmente, a literatura é escassa em modelos de autotransplante de fígado. Na década de 60 e 70, os poucos modelos descritos em animal de grande porte serviam como grupo controle no estudo da rejeição aguda do enxerto e eram considerados trabalhosos devido ao curto comprimento dos vasos, sofrendo muitas vezes adaptações, como a simples oclusão vascular no lugar da anastomose^{52,53}. Assim, o autotransplante hepático em animais de grande porte foi, por um longo período, negligenciado, possivelmente por não haver um modelo eficiente.

O Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Órgãos do Aparelho Digestivo (LIM 37) possui tradição em desenvolver modelos inovadores pré-clínicos em transplante de órgãos sólidos utilizando alo e xeno-enxertos e cirurgia hepato-bilio-pancreática⁵⁴⁻⁶⁰. Ciente da escassez de modelos de autotransplante hepático em animal de grande porte na literatura e das suas vantagens frente aos modelos alogênicos, a disciplina conduziu entre 2010 e 2011 o projeto titulado “Padronização de Modelo Experimental de Autotransplante Hepático em Porcos”. O projeto tinha como objetivo padronizar um modelo experimental – com o uso de circulação extracorpórea - de treinamento técnico-cirúrgico dos residentes e estagiários do serviço, em animal de grande porte, para o aperfeiçoamento da cirurgia do transplante de fígado, assim como utilizá-lo para fins de pesquisa. Durante o período, foram realizados 23 experimentos utilizando circulação extracorpórea. Destes, nove animais (39 %) faleceram antes do término do experimento em consequência de problemas na circulação extracorpórea. Mantendo a premissa de minimizar o custo do treinamento e o sacrifício de animais, e igualmente viabilizar um modelo experimental que atendesse à necessidade do laboratório de pesquisa em transplante de órgãos do aparelho digestivo, foi necessária a busca de um modelo, até então não utilizado, sem o uso da circulação extracorpórea.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Desenvolver e testar um modelo de autotransplante de fígado em suíno sem o uso de circulação extracorpórea.

3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental

Trata-se de um estudo experimental sobre transplante de fígado em animal de grande porte, porco. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo experimento e grupo controle (SHAM). No grupo experimento, os animais foram submetidos à técnica de autotransplante hepático sem mecanismo de circulação extracorpórea. Após o término do procedimento cirúrgico, os animais foram observados por no mínimo uma hora, ainda sob efeito anestésico, quando foram então sacrificados (Figura 4).

A coleta de dados foi realizada em tempos previamente determinados ao longo do procedimento cirúrgico, conforme a seguir: B – Primeira coleta, logo após a indução anestésica (basal); AXC – Segunda coleta, realizada no decorrer da confecção da anastomose da veia porta e sob efeito do clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR – Terceira coleta, 5 minutos após a reperusão do fígado; T – Quarta e última coleta, ao término do experimento, imediatamente antes da eutanásia do animal (término). Em todos estes tempos, foram feitas as seguintes análises:

- i. Parâmetros hemodinâmicos (Anexo A): frequência cardíaca, pressão arterial média, pressão venosa central e a concentração final expiratória de dióxido de carbono;
- ii. Laboratoriais: avaliação metabólica através da gasometria arterial (pH, pressão de dióxido de carbono, *base excess*, bicarbonato, lactato e potássio) e enzimas hepáticas [aminotransferase de aspartato, aminotransferase de alanina, fosfatase alcalina, gamaglutamiltransferase, bilirrubina total].

No último tempo “T”, foi também realizada biópsia do fígado para análise histopatológica. A coleta de dados no grupo SHAM nos tempos “AXC”, “5PR” e “T” foi determinada pela média dos respectivos tempos obtidos no grupo experimento.

Figura 4 - Organograma representativo do delineamento do estudo. GE: grupo experimento; SH: grupo controle; B: primeira coleta de dados (basal); AXC: segunda coleta de dados; SPR: terceira coleta de dados; T: quarta coleta de dados (término).

3.2. Amostra

Todos os animais foram manipulados de acordo com as normas brasileiras para a prática didático-científico da vivisseção, Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008,

Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, que regulamentam os procedimentos com animais submetidos à pesquisa científica e a resolução nº 714 de 20 de julho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) que regula os procedimentos de eutanásia. Este projeto foi aprovado em 25 de março de 2015 pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob número 057/15 (Anexo B).

Para o cálculo da amostra, os parâmetros utilizados foram um poder estatístico de 80%, alfa unidirecional de 5%, taxa de sucesso – sobrevivência do animal até o final do experimento - no grupo experimento e controle de 50% e 100%, respectivamente. Baseado nisso, a indicação do tamanho amostral foi de 8 animais em cada grupo. Todavia, como supostamente a variância no grupo controle é baixa, optou-se por trabalhar com um número reduzido neste grupo a fim de evitar o sacrifício desnecessário de animais. Desta forma, os grupos foram compostos da seguinte maneira:

- A. Grupo experimento (GE) – composto por 8 animais
- B. Grupo controle (SH) – composto por 3 animais

A espécie utilizada foi a *Sus domesticus*, híbrida das raças Large White, Duroc e Pietraln, de ambos os sexos, com peso variando entre 20kg e 26kg. Foram incluídos no estudo apenas animais considerados hígidos de acordo com avaliação clínica e laboratorial (hemograma e gasometria venosa) prévia. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Órgãos do Aparelho Digestivo da FMUSP (LIM 37) (Figura 5). Os animais receberam água e dieta *ad libitum* até 12 horas antes do experimento e foram divididos, conforme mencionado anteriormente, em dois grupos.

Figura 5: Centro cirúrgico para procedimentos em animais de grande porte do Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Órgãos do Aparelho Digestivo da FMUSP (LIM 37).

3.3. Procedimento Anestésico

Os animais foram pré-medicados, 15-30 minutos antes da indução anestésica, com a associação de midazolam (0,5mg/kg) e cetamina (5mg/kg), administrados pela via intramuscular em região cervical através de um scalpe 21G. Posteriormente, foram posicionados em mesa cirúrgica em decúbito ventral e um acesso periférico foi obtido com a punção de veia auricular com cateter tipo Jelco® 20 G. Procedeu-se então a indução anestésica com propofol (5mg/kg) seguido de intubação orotraqueal com cânula 7,5Fr.

A ventilação mecânica foi mantida com o aparelho anestésico Siemens® modelo SV900C, em modo controlada a volume (8-10mL/kg), e a manutenção anestésica com isoflurano inalatório na concentração de 1,5%. O relaxamento muscular foi obtido com pancurônio – bolus intravenoso de 0,1mg/kg seguido de 0,1mg/kg/h em infusão contínua – e a analgesia através da administração intravenosa contínua de fentanil 0,2µg/kg/min. Foram então posicionados em decúbito dorsal sobre manta térmica acoplada ao aquecedor Nellcor 5800 Warm Touch® (Mallinckrodt Medical).

A monitorização não invasiva consistiu em cardioscopia, oximetria de pulso, capnografia e temperatura. Para acesso a monitorização invasiva, foram realizadas incisões longitudinais paratraqueais bilateralmente. À esquerda, foi dissecada a veia jugular interna correspondente e introduzido um cateter duplo-lúmen para medida de PVC e coleta de exames laboratoriais. À direita, foram dissecadas a veia jugular interna e a artéria carótida interna correspondentes e posicionada sonda uretral 12Fr - para infusão de fluido – e cateter duplo-lúmen – para monitorização arterial invasiva e coleta de gasometria arterial -, respectivamente.

Durante todo o experimento todos os animais foram mantidos sob infusão endovenosa contínua de Ringer Lactato® em bomba aquecido a 10mL/kg/h. Imediatamente antes da reperfusão, foi administrado ao grupo experimento 2mg/kg de bicarbonato de sódio. Ringer Lactato® - em bolus 250-500mL aquecido – e adrenalina – em bomba de infusão e/ou em bolus – foram administrados após a reperfusão do enxerto sempre que necessário a fim de manter a pressão arterial média acima de 65-70mmHg.

A eutanásia foi efetuada através de injeção letal endovenosa de 20mL de cloreto de potássio a 19,1% após elevação da concentração de isoflurano para 5% durante 5 minutos. O animal foi acondicionado em saco plástico branco para descarte de material biológico e incinerado em local apropriado por empresa terceirizada pela FMUSP.

3.4. Padronização do Procedimento Cirúrgico

O procedimento foi adaptado para mimetizar ao máximo a técnica de transplante de fígado convencional empregada na prática clínica pela Disciplina de Transplante de Órgãos do Aparelho Digestivo, visando ao treinamento técnico. Todas as etapas dos procedimentos cirúrgicos foram realizadas por residente ou estagiário da Disciplina de Transplante de Órgãos do Aparelho Digestivo, assistidos pelo pesquisador executante, ambos trabalhando com magnificação por meio de lupa com aumento de 3,5 vezes (campo estendido).

No grupo experimento, foram coletados dados referentes ao (Anexo A):

- Tempo de cirurgia
- Tempo de clampeamento da aorta supracelíaca
- Período anepático
- Período pós-reperfusão

- Tempo para confecção das anastomoses vasculares
- Tempo para confecção da anastomose biliar

Foram considerados o início e o fim do período anepático o momento em que a veia porta foi clampeada e o da reperfusão do órgão, respectivamente. Tal período foi contabilizado conforme a demanda, não tendo sido pré-determinado o tempo para reperfusão.

3.4.1. Incisão

O acesso à cavidade abdominal se deu através de uma incisão em “J” (Figura 6A). Uma cistostomia cirúrgica por contra abertura foi realizada inicialmente (Figura 6B). Posteriormente, foi ressecado o apêndice xifoide com eletrocautério e posicionado afastador autoestático subcostal (Figura 6C). Anteriormente ao presente estudo era utilizada a incisão mediana xifopúbica. Porém, esta foi abandonada, pois frequentemente as alças intestinais saíam da cavidade, causando torção dos vasos mesentéricos, o que resultava em diminuição do fluxo portal e subsequente comprometimento da hemodinâmica do animal.

Figura 6 – Representação da abertura da cavidade. (A): Aspecto da incisão em “J”; (B): Cistostomia cirúrgica realizada por contra-abertura; (C): Aparência final do campo operatório após ressecção do apêndice xifoide e posicionamento do afastador.

3.4.2. Dissecção

Após liberação dos ligamentos falciforme e triangular esquerdo, a dissecção voltou-se para o hilo hepático. É importante salientar que todas as estruturas nobres da região foram cuidadosamente dissecadas, visto que as mesmas foram utilizadas na implantação do órgão. A dissecção teve início logo acima da borda superior do duodeno em busca da via biliar, que foi então isolada e seccionada entre ligaduras de fio de algodão 3-0 (Figura 7).

Figura 7 – Hilo hepático: início da dissecção. (A): Demonstração da altura da dissecção inicial do ligamento hepatoduodenal, representado pela linha branca. (B): Exposição da secção da via biliar entre ligaduras. Nota-se a presença de pedaços de *vessel loop* interpostos à ligadura a fim de minimizar o trauma a estrutura.

Continuou-se lateralmente a dissecação seguindo a borda superior do duodeno e pâncreas, até a identificação da artéria gastroduodenal, que foi igualmente isolada e seccionada entre ligaduras de fio de algodão 3-0 (Figura 8). Acima deste nível, não foi realizada dissecação das estruturas hilares, seguindo os preceitos clínicos de não manipular o enxerto acima da artéria gastroduodenal. Após encontrar a sua origem e a artéria hepática comum, prosseguiu-se a dissecação seguindo a borda inferior da artéria hepática esquerda, com secção da artéria gástrica direita entre ligaduras com fio de algodão 3-0 e, subsequentemente, liberação completa do ligamento hepatogástrico até o nível da veia hepática esquerda (Figura 9).

Figura 8 – Início da dissecação do ligamento hepatogástrico. A dissecação do ligamento hepatogástrico (linha tracejada amarela) iniciou-se com a identificação da artéria gastroduodenal (reparada entre fios), posterior e ligeiramente lateral à via biliar (seta azul) e logo acima da borda superior do pâncreas.

Figura 9 – Término da disseção do ligamento hepatogástrico. (A): Ao nível da artéria gastroduodenal (seta), a artéria hepática no suíno se trifurca em: artéria hepática direita lateral, artéria hepática direita medial – ambas não visualizadas na disseção - e artéria hepática esquerda (em vermelho). Esta última em seguida se bifurca em artéria hepática medial esquerda (amarelo) e artéria hepática lateral esquerda (azul)⁶¹. Para completa liberação do ligamento hepatogástrico, a disseção prosseguiu junto à borda inferior da artéria hepática esquerda até o encontro da artéria gástrica direita (verde), que foi seccionada entre ligaduras. (B): Aspecto final após a liberação completa do ligamento hepatogástrico. Identificam-se as artérias gastroduodenal (seta preta) e gástrica direita (seta branca) ligadas.

A dissecação retornou-se então novamente para o hilo hepático, realizando-se a secção do peritônio posterior. Progrediu-se o descolamento duodenopancreático e a dissecação proximal simultânea da veia porta - com ligadura de uma tributária pancreática - e artéria hepática, a fim de ganhar comprimento (cerca de 4 cm) para as futuras anastomoses. Em seguida, e por último, a veia porta e a artéria hepática foram isoladas uma da outra (Figura 10).

Figura 10 – Hilo hepático: aspecto final da dissecação. Artéria gastroduodenal tracionada por pinça. Identificam-se: a via biliar (seta preta), a artéria gástrica direita ligada (seta branca), a veia porta (VP) e a artéria hepática (AH).

Seguiu-se com a secção do ligamento retrohepático, equivalente no humano ao ligamento triangular direito³², desde a veia hepática direita até a glândula adrenal ipsilateral. Posteriormente, descolou-se o pâncreas da face anterior da veia cava inferior (VCI) infra-hepática, similar à manobra de Kocher em humano, até a visualização da inserção da veia renal esquerda (Figura 11). Terminou-se o preparo para hepatectomia total com a dissecação da parede posterior da VCI supra-hepática, com ligadura da veia tributária diafragmática posterior. Ligaduras “perdidas” com fio de polipropileno 4-0 foram realizadas nas veias diafragmáticas direita e esquerda (Figura 12). A parede anterior da VCI supra-hepática não foi dissecada visto que está firmemente aderida ao diafragma, evitando-se assim lesão vascular iatrogênica.

Figura 11 – Descolamento do pâncreas da face anterior da veia cava inferior infra-hepática. (A): Plano de dissecação do pâncreas para exposição da face anterior da veia cava inferior (linha amarela tracejada), manobra esta similar à manobra de Kocher em humano. (B): Aspecto final da exposição da face anterior da veia cava inferior infra-hepática até visualização da inserção da veia renal esquerda (seta branca).

Figura 12 – Dissecção da veia cava inferior supra-hepática. Demonstração da dissecção da parede posterior da veia cava inferior supra-hepática, com ligadura da veia diafragmática posterior (seta branca), fundamental para o bom posicionamento da pinça vascular. Esta manobra permitiu posicionar a pinça vascular o mais cranial possível a fim de ganhar espaço para a futura reconstrução vascular. Nota-se ainda na foto ligadura “perdida” da veia diafragmática direita (seta preta).

Por fim, a aorta supracelíaca foi então isolada e reparada com *vessel loop* através da abertura do pilar diafragmático esquerdo, após retração caudal do baço e fundo gástrico com a mão esquerda do auxiliar (Figura 13). O que foi descrito até o momento foi realizado em ambos os grupos. As etapas subsequentes “Hepatectomia Total e Cirurgia de Bancada” e “Implante” foram realizadas apenas no grupo experimento. Desta forma, o grupo SHAM não foi submetido a nenhum clampeamento vascular.

Figura 13 – Dissecção da aorta supracelíaca. Optou-se pela dissecção da aorta supracelíaca (*vessel loop* amarelo) através do pilar diafragmático esquerdo, ao invés do direito, a fim de retirar do campo operatório a pinça vascular utilizada durante o período anepático.

3.4.3. Hepatectomia Total e Cirurgia de Bancada

No grupo experimento, a sequência de clampeamento vascular se deu na seguinte ordem: aorta supracelíaca, veia porta e artéria hepática simultaneamente utilizando um só clamp vascular, VCI infra-hepática e VCI supra-hepática. Então, seccionou-se a artéria hepática, a veia porta, a VCI infra-hepática e a VCI supra-hepática sucessivamente, completando-se a hepatectomia total. Os vasos não foram seccionados imediatamente após os respectivos clampeamentos com o propósito de reduzir o intervalo entre o clampeamento da aorta supracelíaca e o da VCI supra-hepática, e assim minimizar o efeito hipertensivo causado pela redistribuição volêmica⁶². Especial cuidado foi tomado durante a secção da VCI supra-hepática com o objetivo de facilitar a futura implantação do órgão (Figura 14). Em seguida, o órgão foi perfundido em bandeja com 500 mL de soro Ringer Lactato a 4 °C: 350-400 mL pela veia porta e 50-100 mL pela artéria hepática. A escolha do volume perfundido foi baseada no estudo de Kjekshus et al.⁶³, que

constatarem que o volume vascular hepático no suíno pesando entre 20kg e 26kg é de $10,0 \pm 0,7\text{mL/kg}$ do peso corpóreo, sendo o volume portal seis vezes maior do que o arterial.

Figura 14 – Secção da veia cava inferior supra-hepática. (A): Com a pinça vascular direcionada para cima, seccionou-se a parede anterior próxima à borda do fígado (a), enquanto que a parede posterior foi seccionada próxima à pinça vascular (b). (B): Aspecto do coto da veia cava inferior supra-hepática no decorrer do preparo da anastomose durante a perfusão do fígado na bandeja. Assim como na prática clínica da Disciplina, passou-se um fio de reparo entre as extremidades na parede posterior – nos suínos no 1/3 lateral direito.

3.4.4. Implante

O fígado foi implantado em posição ortotópica e as anastomoses realizadas da seguinte forma e sequência:

1. Anastomose da VCI supra-hepática utilizando sutura contínua com fio de polipropileno 4-0 (Figura 15A);

2. Anastomose da VCI infra-hepática utilizando sutura contínua com fio de polipropileno 5-0 e realização do fator de crescimento (Figura 15B);
3. Anastomose da veia porta utilizando sutura contínua com fio de polipropileno 6-0 e realização de fator de crescimento. Anterior ao seu início foi aberta a pinça vascular a fim de averiguar o fluxo, simulando a prática clínica. Após seu término, deu-se a revascularização do órgão (Figura 15B);
4. Anastomose da artéria hepática utilizando pontos separados com fio de polipropileno 7-0 (Figura 15B);
5. Anastomose da via biliar utilizando sutura contínua com fio de polipropileno 6-0.

Figura 15 – Aspecto final das anastomoses vasculares. (A): Aspecto final da anastomose da veia cava inferior supra-hepática; (B): Aspecto final das anastomoses da veia cava inferior infra-hepática (§), da veia porta (¥) e da artéria hepática (*).

A retirada dos *clamps* vasculares se deu na seguinte ordem: aorta supracelíaca, VCI supra-hepática, VCI infra-hepática e veia porta. Após a reperusão do enxerto e anastomose arterial, liberou-se a artéria hepática.

3.4.5. Fechamento

A síntese da parede abdominal se deu em sutura contínua e plano total com fio de polipropileno 2. Após um período mínimo de 1h de observação, os animais foram reabertos e realizada biópsia hepática por agulha de tru-cut 14Fr no domo do lobo medial esquerdo. A parede abdominal foi, então, ressuturada como descrito anteriormente.

3.5. Análise Laboratorial

As amostras de sangue foram coletadas em tempos específicos e através dos acessos vasculares descritos nas seções “Delineamento Experimental” e “Procedimento Anestésico”, respectivamente.

A gasometria arterial foi feita em um radiômetro ABL 800 FLEX (Radiometer, Copenhagen, Dinamarca) por método de eletrodos de íons seletivos. Em relação à bioquímica, a quantificação da AST e ALT foi executada pelo método cinético ultravioleta e da FA, GGT e bilirrubinas pelo colorimétrico, através do aparelho Cobas c111 (Rocher, Indianápolis, EUA). Os resultados foram expressos seguindo as recomendações do Sistema Internacional de Medidas, conforme exposto na Tabela 1.

Tabela 1 – Unidades de medida utilizadas na expressão dos resultados laboratoriais

	Unidade de medida
Potássio	mEq/l
AST, ALT, FA e GGT	U/l
BT, lactato	mg/dl
pH	-
Base excess e bicarbonato	mmol/l
PaCO ₂	mmHg

NOTA: mEq/l: miliequivalentes por litro; U/l: unidades por litro; mg/dl: miligramas por litro; mmol/l: milimole por litro; mmHg: milímetros de mercúrio; AST: aminotransferase de aspartato; ALT: aminotransferase de alanina; FA: fosfatase alcalina; GGT: gamaglutamiltransferase; BT: bilirrubina total; PaCO₂: pressão arterial de dióxido de carbono.

3.6. Análise histopatológica

O material proveniente das biópsias hepáticas dos últimos 7 animais (4 no grupo experimento e 3 no grupo controle) foi fixado em formalina neutra tamponada a 10 % e, em seguida, imersa em parafina. Foram preparadas lâminas de cortes histológicos com espessura de 4 μ m, corados com hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico por um patologista experiente, sem que o mesmo tivesse conhecimento dos grupos estudados. Foram analisadas as alterações referentes a: necrose hepatocelular, apoptose, infiltrado inflamatório, hemorragia, dilatação sinusoidal, tumefação e macroesteatose, baseado no estudo de Canedo et al.⁶⁴. As mesmas foram classificadas em: ausente, leve, moderada ou grave. As variáveis classificadas como ausente ou leve foram categorizadas como “ausente” e as classificadas como moderada ou grave como “presente”.

3.7. Análise Estatística

Os resultados encontrados foram analisados com o uso do programa Microsoft Excel[®] (2010). A análise descritiva foi realizada através do cálculo da média, desvio padrão, mediana, primeiro quartil e terceiro quartil para as variáveis quantitativas, e da proporção para as variáveis qualitativas.

A análise estatística das variáveis quantitativas foi feita em duas etapas através de testes não-paramétricos. Primeiramente foram analisados os dados encontrados no grupo experimento comparando os tempos entre si (análise de amostras relacionadas). Considerou-se como hipótese nula que as médias encontradas nos quatro tempos eram iguais. Para tal, foi utilizado o teste de Friedman com teste *post-hoc* de Nemenyi. Em seguida, foram analisados os achados comparando o grupo experimento com o grupo controle (SHAM) em cada tempo, separadamente (análise de duas amostras independentes). Considerou-se como hipótese nula a ausência de diferença entre as médias encontradas nos dois grupos. Para esse fim, lançou-se mão do teste de Mann-Whitney. A análise estatística das variáveis qualitativas foi realizada através do teste exato de Fisher. Os resultados estatísticos foram considerados significantes quando $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Empregando a técnica padronizada neste trabalho, obteve-se 100% de sobrevivência dos animais até o término do experimento, todos estáveis hemodinamicamente, quase todos do grupo experimento em uso de droga vasoativa (exceto um animal). Os grupos foram semelhantes em relação ao peso, sendo a média de $23,63 \pm 1,92$ kg e $22,0 \pm 1,73$ kg no grupo experimento e controle (SHAM), respectivamente ($p < 0,278$).

4.1. Análise do Procedimento Cirúrgico

O tempo médio de cirurgia do grupo experimento foi de $216,75 \pm 20,95$ min. Considerando o período pós-reperusão do órgão, os animais foram observados por um tempo médio de $136 \pm 12,50$ min, com um período médio de clameamento da aorta supracelíaca e anepático de $51,25 \pm 7,44$ min e $47,88 \pm 8,03$ min, respectivamente. O tempo médio e o desvio padrão para confecção das anastomoses são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Tempo médio e desvio padrão para confecção das anastomoses vasculares e biliar (em minutos)

Anastomose	Média	Desvio padrão
VCI supra-hepática	11,50	3,25
VCI infra-hepática	6,13	3,23
Veia porta	6,50	1,51
Artéria hepática	14,38	6,07
Via biliar	5,88	0,99

NOTA: VCI: veia cava inferior

4.2. Análise dos Parâmetros Hemodinâmicos

A Tabela 3 representa os valores encontrados das variáveis hemodinâmicas - frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), pressão venosa central (PVC) e concentração expiratória final de dióxido de carbono (EtCO_2) - expressos em média e desvio padrão em cada tempo.

Tabela 3 – Média e desvio padrão das variáveis hemodinâmicas do grupo experimento nos diferentes tempos

	B	AXC	5PR	T	<i>p</i> *
FC (bpm)	113,50 ± 10,39	178,38 ± 11,02	152,63 ± 19,81	150,75 ± 20,90	B-AXC < 0,0001 B-5PR = 0,047 AXC-T = 0,016
PAM (mmHg)	83,50 ± 8,57	84,25 ± 9,59	73,75 ± 11,54	71,88 ± 5,62	AXC-5PR = 0,036 AXC-T = 0,021
PVC (cmH ₂ O)	11,13 ± 5,94	11,13 ± 5,54	14,63 ± 5,01	12,00 ± 6,26	AXC-5PR = 0,047
EtCO ₂ (mmHg)	38,13 ± 4,09	18,75 ± 7,59	32,25 ± 10,12	30,75 ± 3,92	B-AXC = 0,001

NOTA: B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperfusão; T: término; FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média; PVC: pressão venosa central; EtCO₂: concentração expiratória final de dióxido de carbono; bpm: batimentos por minuto; mm Hg: milímetros de mercúrio; cm H₂O: centímetros de água; **p-value*: Análise estatística significativa através do teste de Friedman com teste *post-hoc* de Nemenyi.

Os gráficos 1, 2, 3 e 4 comparam estas variáveis entre o grupo experimento e o SHAM.

Gráfico 1 – Box-plot representativo da frequência cardíaca nos grupos experimento e controle. GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM); B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperfusão; T: término; Mean: média. *AXC: GE ≥ SH ($p = 0,012$).

Gráfico 2 – Box-plot representativo da pressão arterial média nos grupos experimento e controle. GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM); B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5` pós-reperusão; T: término; Mean: média. *T: SH $\geq$ GE ($p = 0,048$)

Gráfico 3 – Box-plot representativo da pressão venosa central nos grupos experimento e controle. GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM); B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5` pós-reperusão; T: término; Mean: média.

Gráfico 4 – Box-plot representativo da concentração expiratória final de dióxido de carbono nos grupos experimento e controle. EtCO₂: concentração expiratória final de dióxido de carbono; GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM); B: basal; AXC: clameamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5^o pós-reperfusão; T: término; Mean: média. *AXC: SH $\geq$ GE ($p = 0,048$)

4.3. Análise Laboratorial

4.3.1. Avaliação Metabólica

Tabela 4 representa os valores encontrados no que concerne às variáveis metabólicas – pH, pressão arterial de dióxido de carbono (PaCO₂), bicarbonato (HCO₃), *base excess* (BE), lactato e potássio (K) - no grupo experimento expressos em média e desvio padrão em cada tempo. Os Gráficos 5, 6, 7, 8, 9 e 10 comparam estas variáveis entre o grupo experimento e o SHAM

Tabela 4 – Média e desvio padrão das variáveis metabólicas do grupo experimento nos diferentes tempos

	B	AXC	5PR	T	<i>p</i> *
pH	7,41 ± 0,08	7,492 ± 0,22	7,07 ± 0,05	7,13 ± 0,14	B-5PR = 0,021 AXC-5PR= 0,002
PaCO ₂ (mmHg)	45,89 ± 8,87	25,91 ± 6,40	55,39 ± 13,16	44,38 ± 8,72	AXC-5PR= 0,002
HCO ₃ (mmol/l)	28,30 ± 2,04	21,27 ± 3,99	15,71 ± 2,56	14,44 ± 5,02	B-5PR = 0,002 B-T = 0,002
BE (mmol/l)	3,90 ± 2,31	-1,88 ± 5,98	-12,53 ± 2,96	-13,20 ± 6,33	B-5PR = 0,003 B-T = 0,003
Lac (mg/dl)	18,50 ± 5,24	47,75 ± 26,08	78,36 ± 20,40	64,63 ± 14,28	B-5PR < 0,0001 B-T = 0,012 AXC-5PR= 0,012
K (mEq/l)	3,94 ± 0,45	4,18 ± 0,73	5,26 ± 0,99	4,56 ± 0,58	B-5PR = 0,002 AXC-5PR= 0,036

NOTA: PaCO₂: pressão arterial de dióxido de carbono; HCO₃: bicarbonato; BE: *base excess*; Lac: lactato; K: potássio. **p-value*: Análise estatística significativa através do teste de Friedman com *post-hoc* de Nemenyi.

Gráfico 5 – Box-plot representativo do pH nos grupos experimento e controle. GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM); B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5^o pós-reperfusão; T: término; Mean: média. *5PR: SH ≥ GE (*p* = 0,012). ¥ T: SH ≥ GE (*p* = 0,024).

Gráfico 6 – Box-plot representativo da pressão arterial de dióxido de carbono. GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM); B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5` pós-reperusão; T: término; Mean: média. *AXC: SH $\geq$ GE ($p = 0,024$).

Gráfico 7 – Box-plot representativo do nível de bicarbonato nos grupos experimento e controle. GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM); B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5` pós-reperusão; T: término; Mean: média. *5PR: SH $\geq$ GE ($p = 0,012$). ¥T: SH $\geq$ GE ($p = 0,012$).

Gráfico 8 – Box-plot representativo do nível do *base excess* nos grupos experimento e controle. GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM); B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término; Mean: média. *5PR: SH $\geq$ GE ($p = 0,012$). ¥T: SH $\geq$ GE ($p = 0,012$).

Gráfico 9 – Box-plot representativo do nível de lactato nos grupos experimento e controle. GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM); B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término; Mean: média. *T: GE $\geq$ SH ($p = 0,024$).

Gráfico 10 – Box-plot representativo do nível de potássio nos grupos experimento e controle. GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM); B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5^o pós-reperfusão; T: término; Mean: média. *5PR: GE $\geq$ SH ($p < 0,048$).

4.3.2. Avaliação das Enzimas Hepáticas

A Tabela 5 representa as enzimas hepáticas no grupo experimento expressas em média e desvio padrão em cada tempo. Os gráficos 11-15 confrontam os resultados encontrados no grupo experimento com os do grupo controle (SHAM).

Tabela 5 – Média e desvio padrão das enzimas hepáticas do grupo experimento nos diferentes tempos

	B	AXC	5PR	T	p^*
BT (mg/dl)	0,073 $\pm$ 0,067	0,11 $\pm$ 0,082	0,11 $\pm$ 0,090	0,18 $\pm$ 0,159	
AST (U/l)	49,75 $\pm$ 35,49	84,38 $\pm$ 72,00	126,75 $\pm$ 84,15	289,63 $\pm$ 174,62	B-T < 0,0001 AXC-T = 0,021
ALT (U/l)	30,63 $\pm$ 21,80	27,00 $\pm$ 19,78	27,00 $\pm$ 17,26	32,76 $\pm$ 20,55	
FA (U/l)	138,70 $\pm$ 112,88	136,41 $\pm$ 139,26	122,66 $\pm$ 87,43	140,18 $\pm$ 104,94	
GGT (U/l)	25,94 $\pm$ 17,14	27,20 $\pm$ 14,86	21,14 $\pm$ 11,70	23,96 $\pm$ 13,49	

NOTA: BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; AST: aminotransferase de aspartato; ALT: aminotransferase de alanina; FA: fosfatase alcalina; GGT: gamaglutaminotransferase. * p -value: Análise estatística significativa através do teste de Friedman com *post-hoc* de Nemenyi.

Gráfico 11 – Box-plot representativo da bilirrubina total nos grupos experimento e controle. GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM). B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5` pós-reperusão; T: término; Mean: média.

Gráfico 12 – Box-plot representativo da aminotransferase de aspartato nos grupos experimento e controle. AST: aminotransferase de aspartato; GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM). B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5` pós-reperusão; T: término; Mean: média. *5PR: GE $\geq$ SH ($p = 0,048$). ¥T: GE $\geq$ SH ($p = 0,012$).

Gráfico 13 – Box-plot representativo da aminotransferase de alanina nos grupos experimento e controle. ALT: aminotransferase de alanina; GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM). B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5` pós-reperfusão; T: término; Mean: média.

Gráfico 14 – Box-plot representativo da fosfatase alcalina nos grupos experimento e controle. GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM). B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5` pós-reperfusão; T: término; Mean: média.

Gráfico 15 – Box-plot representativo da gamaglutamiltransferase nos grupos experimento e controle. GGT: gamaglutamiltransferase; GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM). B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperfusão; T: término; Mean: média.

4.4. Análise Histopatológica

Encontram-se na Tabela 6 os dados referentes aos achados histopatológicos. Nota-se que 75% dos animais do grupo experimento apresentaram infiltrado inflamatório e tumefação, e 50% macroesteatose (Figura 16 e 17).

Tabela 6 – Análise dos achados histopatológicos

	Grupos	Ausente	Presente	Teste de Fisher
Necrose	GE	3	1	0,571
	SH	3	0	
Apoptose	GE	3	1	0,571
	SH	3	0	
Infiltrado inflamatório	GE	1	3	0,571
	SH	3	0	
Dilatação sinusoidal	GE	0	4	0,714
	SH	3	0	
Hemorragia	GE	3	1	> 1,00
	SH	3	0	
Balonização	GE	1	3	0,371
	SH	2	1	
Macrosteatose	GE	2	2	0,286
	SH	3	0	

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo controle (SHAM).

Figura 16 - Micrografia do fígado do grupo experimento. Aspecto histológico demonstra tecido hepático com áreas mais pálidas. Nestas áreas a esteatose macrovesicular (macro-esteatose) está mais evidente e de forma mais difusa. Há ainda extensa área de hemorragia do tecido, onde se observa também a necrose do parênquima, decorrente da hemorragia. (Hematoxilina-Eosina - 100X)

Figura 17 – Micrografia do fígado do grupo experimento. Aspecto histológico demonstra o parênquima hepático de área pálida, onde se observam células inflamatórias em meio aos sinusóides com distribuição difusa nestes (setas amarelas) e a presença de macro-esteatose evidenciada por gotículas claras no citoplasma de hepatócitos (setas vermelhas). (Hematoxilina-Eosina - 400X)

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O modelo de autotransplante ortotópico de fígado desenvolvido no presente estudo é o primeiro, para o conhecimento do pesquisador em literatura de língua inglesa, a utilizar o clampeamento da aorta supracelíaca durante a fase anepática. Com esta manobra obteve-se estabilidade hemodinâmica do animal, tornando desnecessária a utilização de mecanismo de circulação extracorpórea e evitando-se suas complicações. Trata-se de um modelo simples, de fácil execução e reprodutível, em virtude de ter sido desempenhado por cirurgiões em período de treinamento. Ainda, por utilizar apenas um animal por procedimento, tem menor custo operacional e é eticamente mais apropriado quando comparado aos modelos alogênicos.

Em 2001, Gruttadauria et al.⁶⁵ descreveram um modelo de autotransplante ortotópico de fígado em suínos com o uso da circulação extracorpórea, defendendo o seu uso não somente no contexto de treinamento em transplante, mas também de ressecção hepática *ex-vivo*. Todavia, tal modelo traz as desvantagens da circulação extracorpórea já citadas anteriormente. Com a finalidade de simplificar o modelo de autotransplante ortotópico hepático, Roveda et al.⁶⁶ propuseram o uso de prótese sintética para substituir a VCI nativa e poder implantar posteriormente o enxerto pela técnica de “piggy-back”. No entanto, os próprios autores relatam um tempo médio de 56 ± 10 min para a interposição da VCI, o que torna questionável a praticidade deste modelo. Gringeri et al.⁶⁷, em 2011, seguindo a ideia de substituir a VCI nativa do animal, descreveu um modelo semelhante utilizando prótese biológica (enxerto de aorta torácica guardada de outro suíno). Porém, dada a diferença de calibre entre o enxerto vascular (2cm) e a VCI supra-hepática (4cm), foi necessária uma rotação de 90° no sentido anti-horário para a implantação do órgão, inconveniente para o treinamento cirúrgico.

Em geral, o clampeamento isolado da aorta supracelíaca induz a aumento da pressão arterial e da resistência vascular sistêmica e periférica⁶⁸, predominantemente secundário à redistribuição do volume sanguíneo dos órgãos e tecidos submetidos a isquemia para um menor compartimento^{62,69,70}. No contexto de exclusão vascular hepática e consequente comprometimento do retorno venoso e da redistribuição volêmica, as alterações hemodinâmicas se dão principalmente por aumento na pós-carga secundário a: 1) aumento repentino na impedância ao fluxo aórtico; e 2) estimulação do

sistema nervoso simpático e do sistema renino-angiotensina^{68,70}. No presente estudo, os benefícios hemodinâmicos desta manobra foram representados pela manutenção dos níveis pressóricos no decorrer da fase anepática, de forma semelhante ao demonstrado em modelos alogênicos^{41,45,46} e de estudos hemodinâmicos em exclusão vascular hepática^{71,72}. Além disso, proporcionou estabilidade para uma fase anepática suficientemente longa para que cirurgias em treinamento pudessem reperfundir o enxerto sem comprometer a sobrevida do animal.

Modelos suínos de transplante hepático sem o auxílio da circulação extracorpórea e adaptações técnicas são descritos na literatura^{30,43,44}. Em comum eles têm o fato de serem modelos alogênicos e possuírem uma curta fase anepática. Todos os trabalhos destacam que para o sucesso do experimento é fundamental um período anepático inferior a 20-30min e, portanto, uma equipe bem treinada e sincronizada, que no contexto de cirurgias em período de capacitação ou mesmo pesquisadores que não sejam cirurgias transplantadores, talvez não seja o mais apropriado. Acrescenta-se a isto o fato de que, apesar da similaridade no que concerne às etapas cirúrgicas entre os modelos de alo e autotransplante, neste o comprimento dos vasos a serem anastomosados é menor, o que pode acarretar dificuldade técnica.

Na presente pesquisa, a estabilidade hemodinâmica alcançada com o clampeamento da aorta supracelíaca permitiu que cirurgias residentes ou estagiários da Disciplina de Transplante de Órgãos do Aparelho Digestivo perfundissem em bancada e implantassem o enxerto em confortável tempo médio de $48,38 \pm 7,8$ min, segundo a técnica convencional utilizada na prática clínica, com boa sobrevida num tempo médio pós-reperusão de cerca de 2h.

O modelo aqui descrito também tem potencial utilização para fins de pesquisa, sobretudo em lesão de isquemia e reperusão hepática, como demonstrado pela presença significativamente maior de balonização e esteatose no grupo experimento em relação ao grupo SHAM. Além disso, é pertinente comentar que, na falta da existência de porco isogênico, possivelmente o presente modelo funcione como grupo negativo em pesquisa sobre rejeição celular aguda em animal de grande porte. Também, o modelo pode permitir experimentos de autotransplante de hepatócitos através da coleta de material durante a cirurgia de bancada, processamento e posterior infusão, semelhante ao descrito por Chaib et al.^{54,73} para transplante de ilhotas pancreáticas. Novos estudos são necessários e estão

sendo projetados no LIM-37 a fim de avaliar o modelo para tais fins, buscando viabilizar um tempo de observação pós-reperusão mais longa.

Na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo existe carência de estrutura para os cuidados pós-operatório em cirurgia de alta complexidade utilizando animais de grande porte compatível com a recomendada pelas normas brasileiras para prática didático-científico da vivisseção e decreto que regulamentam os procedimentos com animais submetidos a pesquisa científica. Desta forma, submeter o animal a eutanásia após um curto período de observação pós-reperusão foi a alternativa mais apropriada. Recentemente, o biotério central passou a dispor de baias para manutenção de animais de grande porte que poderão ser adaptadas para receber animais do presente estudo. Um tempo de observação pós-reperusão mais longo é necessário para compreender melhor o modelo desenvolvido, visto que algumas pesquisas observaram que as manifestações laboratoriais e histológicas predominam entre 6-48h após a reperusão^{74,75}. Igualmente, um tempo de observação pós-reperusão mais longo é necessário para entender as reais consequências do clampeamento da aorta supracelíaca na lesão de isquemia e reperusão do enxerto, assim como suas repercussões sistêmicas no cenário de autotransplante hepático.

Ainda, confere limitação ao presente estudo o não registro quantitativo relativo a infusão de droga vasoativa entre a reperusão e o término do experimento. Adrenalina foi deliberadamente administrada, porém não foi possível analisar a dosagem requerida da droga para manter a estabilidade hemodinâmica do animal e nem se a necessidade aumentava ou diminuía no decorrer do experimento. O que é seguramente possível afirmar é que, dentre os 8 animais submetidos ao autotransplante, um não usava droga vasoativa ao término do experimento.

A remoção do clampeamento da aorta supracelíaca é consistentemente associada a uma redução significativa da resistência vascular e consequente diminuição da pressão arterial^{68,76}. O sistema vascular nas áreas previamente isquêmicas sofre grave vasodilatação devido ao acúmulo de adenosina, lactato e dióxido de carbono durante a supressão da perfusão. Isto conduz a um aumento da sua capacitância acima do fisiológico, provocando um deslocamento do fluxo e volume sanguíneo para as áreas reperfundidas e consequente hipovolemia central. Simultaneamente, esses mesmos mediadores são lavados das áreas previamente isquêmicas para a circulação, levando a uma vasodilatação adicional, contribuindo para a diminuição da pressão arterial^{68,70}.

Além da hemodinâmica, o clampeamento da aorta supracelíaca pode também repercutir em outros sistemas.

O sangramento perioperatório é uma das principais causas de morte precoce após o reparo cirúrgico dos aneurismas de aorta torácica descendente e toracoabdominal^{77,78}. Apesar de ainda não ser totalmente esclarecido, postula-se que tal sangramento seja secundário ao consumo de fatores de coagulação e à ativação do sistema fibrinolítico causados pela isquemia do território esplâncnico⁷⁸⁻⁸⁰. No final dos anos 80s, Cohen et al.⁸¹ demonstraram, utilizando modelo canino, que os clampeamentos da aorta supracelíaca por 60min e 90min estavam significativamente associados a uma redução da contagem de plaquetas e concentração de fibrinogênio, e a um alargamento do tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial quando comparados a 30min de clampeamento. Em estudo subsequente, Cohen et al.⁸² acrescentaram ao precedente um modelo experimental portando shunt proveniente da aorta proximal ao clampeamento supracelíaco para a artéria mesentérica superior e igualmente divididos e submetidos a isquemia por 30min, 60min e 90min. Eles constataram que a perfusão arterial contínua através da artéria mesentérica superior, e portanto do território esplâncnico, preveniu a ocorrência de coagulopatia intravascular disseminada, mesmo no grupo submetido a 90 min de clampeamento, propondo ser a isquemia esplâncnica a causa do distúrbio da hemostasia. Estudos mais recentes reforçam este racional.

Anagnostopoulos et al.⁸³ delinearam um estudo formado por dois grupos de suínos: 1) submetido a 30min de clampeamento da aorta supracelíaca; e 2) submetido a igual tempo de clampeamento da aorta infra-renal. O período de observação pós-reperusão foi de 60min. Verificaram que no primeiro houve ativação da cascata de coagulação, com intensa geração de trombina por até 30min após reperusão, associado a significativa diminuição do nível de plaquetas e fibrinogênio nos primeiros 30min e 60min após reperusão, respectivamente, quando comparados aos níveis basais. Observou-se também ativação da via fibrinolítica através do significativo aumento do nível de ativador do plasminogênio tecidual, apesar de este aumento quantitativo não ter representado aumento de sua atividade e, por tanto, real estado de hiperfibrinólise. No grupo submetido a 30min de clampeamento da aorta infra-renal nenhuma perturbação laboratorial significativa relacionada a coagulação foi observada no decorrer do experimento. No entanto, quando submetido a 60min de isquemia, Haithcock et al.⁸⁰, em trabalho similar ao descrito anteriormente, demonstraram não somente a estimulação das vias

fibrinolíticas como o estado de hiperfibrinólise através do significativo aumento do nível e da atividade do ativador do plasminogênio tecidual, até 30min após reperfusão, no grupo de animais submetidos ao clampeamento da aorta supracelíaca. Novamente, nenhuma alteração significativa relacionada a coagulação no grupo submetido a clampeamento infra-renal foi constatada. É conjectura, contudo, inferir que a isquemia causada pelo clampeamento da aorta supracelíaca num cenário de exclusão vascular hepática agravaria a já comprometida perfusão do território esplâncnico.

Estudos experimentais sinalizam que o distúrbio de perfusão do território esplâncnico causado pela congestão sobrepõe-se a isquêmico no contexto semelhante ao descrito no presente trabalho. Cruz et al.⁷¹ avaliaram a perfusão esplâncnica através da medida da pressão de dióxido de carbono e pH da mucosa gástrica, e taxa de extração de oxigênio no sistema esplâncnico em modelo canino. Os animais foram divididos em dois grupos: 1) submetido a 30min de exclusão vascular hepática isolada; e 2) submetidos a igual período de exclusão vascular hepática e clampeamento da aorta supracelíaca simultaneamente. Os animais foram observados por um período de 60min pós-reperfusão. Significante redução no pH e aumento na pressão de dióxido de carbono da mucosa gástrica, assim como significativo aumento da extração de oxigênio no sistema esplâncnico foram constatados em ambos os grupos, quando comparados aos níveis basais. Diferenças entre os grupos, todavia, não foram encontradas. Segundo o método utilizado, o clampeamento da aorta supracelíaca não interferiu no distúrbio de perfusão causado pela exclusão vascular hepática. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Cruz et al.⁸⁴ estudaram separadamente a lesão isquêmica e congestiva do território esplâncnico. Em modelo canino, formaram dois grupos: 1) submetido a 45min de oclusão da artéria mesentérica superior; e 2) submetido a igual período de oclusão da veia mesentérica superior. Observaram os animais periodicamente por 120min. Avaliaram, além da gasometria arterial sistêmica, os gradientes artério-venoso da pressão do dióxido de carbono e do lactato dos vasos mesentéricos, a oferta, consumo e extração de oxigênio esplâncnico, e amostras histológicas do íleo terminal segundo o score descrito por Chiu et al.⁸⁵. Notaram no grupo submetido a oclusão da veia mesentérica superior significativa piora da hiperlactatemia e acidose metabólica sistêmicas, quando comparado aos níveis basais e ao outro grupo. Igualmente, constataram significativa deterioração dos gradientes artério-venoso da pressão do dióxido de carbono e do lactato dos vasos mesentéricos, e na oferta, consumo e extração de oxigênio esplâncnico. Ainda, a lesão histológica foi

mais grave no grupo submetido a oclusão da veia mesentérica superior. Ou seja, tanto as repercussões metabólicas sistêmica e regional, como a histológica, foram mais exuberantes no grupo submetido a oclusão da veia mesentérica superior quando comparado ao submetido a oclusão da artéria mesentérica superior. Desta forma, é possível que o clampeamento da aorta supracelíaca no modelo suíno de autotransplante hepático não adicione efeitos deletérios ou, até mesmo, traga benefícios locais e/ou sistêmicos.

O presente estudo obteve êxito ao desenvolver um modelo de autotransplante de fígado em suíno sem a utilização de mecanismos de circulação extracorpórea. Para tanto, utilizou-se, durante o período anepático, o clampeamento da aorta supracelíaca a fim de manter a hemodinâmica do animal estável. Empregando este modelo, residentes e estagiários da Disciplina de Transplante de Órgãos do Aparelho Digestivo necessitaram em média de $47,88 \pm 8,03$ min para perfundir o enxerto em bancada e realizar as reconstruções vasculares, alcançando 100% de sobrevida cerca de 2h após a reperfusão do enxerto, com todos os animais hemodinamicamente estáveis. Portanto, trata-se de um modelo simples, de fácil execução e reprodutível, em virtude de ter sido desempenhado por cirurgiões em período de treinamento. Ainda, por utilizar apenas um animal por procedimento, tem menor custo operacional e é eticamente mais apropriado quando comparado aos modelos alogênicos.

Futuros estudos estão sendo delineados para analisar a curva de aprendizado dos residentes e estagiários da Disciplina de Transplante de Órgãos do Aparelho em relação à presente técnica cirúrgica, assim como para avaliar o desempenho na prática clínica antes e após o treinamento. Além disso, intencionamos realizar pesquisas para avaliar a sobrevida prolongada do presente modelo, visando avaliar mecanismos de controle das lesões decorrentes da isquemia e da reperfusão hepática por meio do uso de novas drogas antioxidantes e do pré-condicionamento isquêmico. Desta forma, é possível utilizar o presente modelo simultaneamente para treinamento cirúrgico e para pesquisa científica, reduzindo os custos operacionais e uso de animais.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

1. De acordo com os métodos utilizados no presente estudo, desenvolveu-se um modelo de autotransplante de fígado em suínos sem utilização de mecanismo de circulação extracorpórea. Para tanto, utilizou-se o clampeamento da aorta supracelíaca durante o período anepático.
2. O modelo padronizado foi testado e mostrou-se ser de fácil execução, com excelente sobrevida no tempo observado, mantendo estabilidade hemodinâmica durante todo o experimento.

7. ANEXOS

ANEXO A – FICHA DE CIRURGIA

TÉCNICA CIRÚRGICA – MODELO DE AUTOTRANSPLANTE DE FÍGADO EM SUÍNOS

Data: _____ Ex. Número: _____ Peso: _____ Sexo: _____
 Solução de preservação: _____ Temperatura: _____
 Anestesia- Início: _____ Fim: _____ Cirurgia- Início: _____ Fim: _____

CLAMPEAMENTOS	Início	Fim
Aorta a abdominal		
Artéria hepática		
Veia porta		
VCI infra hepática		
VCI supra hepática		

Hepatectomia:	Reperusão:
---------------	------------

ANASTOMOSES	Início	Fim
VCI supra hepática		
VCI infra hepática		
Veia porta		
Artéria hepática		
Via biliar		

	Basal	Ao Clamp	5"Revasc	Término
T				
FC				
PAS				
PAD				
PAM				
PVC				

ANEXO B – APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DOS ANIMAIS (CEUA)

A **CEUA** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/03/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **057/15** intitulado: “**Avaliação comparativa de modelos experimentais de autotransplante de fígado em suínos**” que utilizará **20** animais da espécie **suíno**, apresentado pelo Departamento de Gastroenterologia.

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

Pesquisador (a) Responsável: Wellington Andraus

Pesquisador (a) Executante: Bernardo Fernandes Canedo

CEUA-FMUSP, 25 de Março de 2015

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

ANEXO C – BASE DE DADOS

Tabela 1 – Dados referentes ao peso (em kg) e aos períodos cirúrgicos (em minutos)

n	Grupo	Peso	ΔCx	ΔAXC	$\Delta Anep$	ΔPR
1	GE	22	196	56	54	111
2	GE	23	222	47	43	144
3	GE	25	209	39	38	128
4	GE	20	222	56	40	158
5	GE	24	182	44	43	124
6	GE	26	248	59	58	135
7	GE	24	220	59	58	132
8	GE	25	235	50	49	156
9	SH	20	257	-	-	-
10	SH	23	219	-	-	-
11	SH	23	228	-	-	-

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; ΔCx : tempo cirúrgico; ΔAXC : tempo de clampeamento da aorta supracelíaca; $\Delta Anep$: período anepático; ΔPR : período pós-reperusão.

Tabela 2 – Dados referentes ao tempo para confecção das anastomoses vasculares e biliar (em minutos)

n	Grupo	$\Delta VCI-SH$	$\Delta VCI-IH$	ΔVP	ΔAH	ΔVB
1	GE	12	196	56	54	111
2	GE	9	222	43	47	144
3	GE	7	209	39	38	128
4	GE	10	222	56	40	158
5	GE	9	182	44	43	124
6	GE	15	248	58	58	135
7	GE	14	220	54	58	132
8	GE	16	235	50	49	156
9	SH	-	-	-	-	-
10	SH	-	-	-	-	-
11	SH	-	-	-	-	-

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; VCI: veia cava inferior; $\Delta VCI-SH$: anastomose da VCI supra-hepática; $\Delta VCI-IH$: anastomose da VCI infra-hepática; ΔVP : anastomose da veia porta; ΔAH : anastomose da artéria hepática; ΔVB : anastomose da via biliar.

Tabela 3 – Dados referentes à frequência cardíaca (em bpm)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	110	176	156	150
2	GE	115	189	145	164
3	GE	93	197	196	190
4	GE	129	164	137	124
5	GE	122	166	130	126
6	GE	115	182	157	153
7	GE	111	175	148	148
8	GE	113	178	152	151
9	SH	105	147	160	144
10	SH	110	160	161	149
11	SH	98	155	148	162

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 4 – Dados referentes à pressão arterial média (em mmHg)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	73	86	100	82
2	GE	86	105	68	70
3	GE	99	74	70	62
4	GE	90	75	63	69
5	GE	78	81	66	72
6	GE	87	82	77	74
7	GE	78	85	75	74
8	GE	77	86	71	72
9	SH	110	96	100	80
10	SH	80	111	102	85
11	SH	92	79	70	77

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 5 – Dados referentes à pressão venosa central (em cmH₂O)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	7	9	18	9
2	GE	7	7	10	8
3	GE	11	8	10	11
4	GE	21	20	21	22
5	GE	20	20	22	22
6	GE	7	9	11	8
7	GE	8	7	11	8
8	GE	8	9	14	8
9	SH	9	16	15	14
10	SH	9	7	6	6
11	SH	11	11	11	9

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 6 – Dados referentes à concentração expiratória de dióxido de carbono (em mmHg)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	35	16	38	35
2	GE	46	19	33	34
3	GE	39	37	47	34
4	GE	35	17	33	25
5	GE	35	14	11	26
6	GE	42	18	35	33
7	GE	38	15	31	31
8	GE	35	14	30	28
9	SH	41	39	36	31
10	SH	36	34	32	33
11	SH	44	35	47	45

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 7 – Dados referentes ao nível de pH

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	7,37	7,02	7,09	7,13
2	GE	7,42	7,53	7,05	7,16
3	GE	7,38	7,49	7,13	7,17
4	GE	7,45	7,59	7,08	7,32
5	GE	7,26	7,46	7,00	7,07
6	GE	7,50	7,57	7,02	7,05
7	GE	7,43	7,49	7,03	6,86
8	GE	7,49	7,78	7,15	7,26
9	SH	7,43	7,37	7,36	7,42
10	SH	7,49	7,45	7,48	7,45
11	SH	7,44	7,39	7,34	7,28

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 8 – Dados referentes ao nível de PaCO₂ (em mmHg)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	50,8	30,3	57,9	56,3
2	GE	45,0	30,0	66,3	54,7
3	GE	44,8	27,7	46,0	45,4
4	GE	46,2	22,3	64,7	40,3
5	GE	64,8	36,6	72,7	50,1
6	GE	37,1	21,1	58,9	38,5
7	GE	38,9	22,7	41,1	31,9
8	GE	39,5	16,6	35,5	37,8
9	SH	40,5	40,0	40,1	31,1
10	SH	32,5	34,8	32,9	35,9
11	SH	43,2	43,5	45,8	49,0

NOTA: PaCO₂: pressão arterial de dióxido de carbono; GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 9 – Dados referentes ao nível de bicarbonato (em mmol/l)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	28,7	15,0	16,7	18,0
2	GE	28,8	24,7	17,5	19,6
3	GE	25,8	21,1	14,7	15,8
4	GE	31,5	21,3	18,3	20,1
5	GE	28,2	25,6	17,2	13,7
6	GE	28,7	19,4	14,4	10,2
7	GE	25,1	17,2	10,3	5,4
8	GE	29,6	25,9	16,6	12,7
9	SH	26,4	22,5	22,3	23,9
10	SH	25,5	24,0	23,9	24,7
11	SH	28,8	25,6	23,9	22,3

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 10 – Dados referentes ao *base excesso* (em mmol/l)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	3,8	-14,1	-11,6	-9,6
2	GE	4,6	1,9	-11,4	-7,8
3	GE	1,2	-1,7	-12,8	-11,1
4	GE	7,3	-0,6	-10,2	-5,0
5	GE	1,8	2,1	-12,4	-14,7
6	GE	5,3	-2,6	-14,7	-18,1
7	GE	1,2	-5,6	-18,4	-25,0
8	GE	6,0	5,5	-8,7	-14,3
9	SH	2,4	2,0	2,2	3,8
10	SH	2,5	0,5	0,7	1,1
11	SH	4,7	1,1	1,2	3,6

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 11 – Dados referentes ao nível de lactato (em mg/dl)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	16	111	82	70
2	GE	19	33	94	54
3	GE	13	32	96	94
4	GE	15	46	67	50
5	GE	29	34	106	63
6	GE	21	41	60	58
7	GE	14	43	45	55
8	GE	21	42	77	73
9	SH	14	63	61	28
10	SH	20	34	33	25
11	SH	20	48	56	53

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 12 – Dados referentes ao nível de potássio (em mEq/l)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	3,9	4,9	4,3	4,5
2	GE	3,9	3,9	4,9	4,3
3	GE	3,9	3,9	4,7	4,2
4	GE	3,8	3,7	5,2	4,9
5	GE	4,7	5,5	6,4	5,3
6	GE	3,7	3,5	5,2	3,9
7	GE	3,2	3,5	6,3	4
8	GE	4,4	4,5	7,2	5,4
9	SH	3,7	3,3	3,3	4,3
10	SH	4,5	4,4	4,7	5,7
11	SH	4,0	3,9	4,0	4,7

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 13 – Dados referentes ao nível de bilirrubina total (em mg/dl)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	0,10	0,10	0,30	0,20
2	GE	0,05	0,02	0,02	0,50
3	GE	0,20	0,20	0,20	0,30
4	GE	0,10	0,10	0,10	0,10
5	GE	0,10	0,20	0,20	0,20
6	GE	0,00	0,20	0,10	0,00
7	GE	0,00	0,00	0,10	0,10
8	GE	0,03	0,06	0,07	0,06
9	SH	0,06	0,04	0,06	0,09
10	SH	0,05	0,02	0,07	0,05
11	SH	0,02	0,02	0,02	0,05

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 14 – Dados referentes ao nível de AST (em U/l)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	88	194	296	330
2	GE	59	61	66	286
3	GE	81	77	111	179
4	GE	39	53	73	103
5	GE	94	201	181	304
6	GE	15	27	24	197
7	GE	9	38	115	681
8	GE	13	24	148	237
9	SH	41	26	22	22
10	SH	38	61	47	67
11	SH	31	41	39	33

NOTA: AST: aminotransferase de aspartato; GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 15 – Dados referentes ao nível de ALT (em U/l)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	46	32	41	47
2	GE	19	17	16	49
3	GE	55	35	34	34
4	GE	57	55	52	55
5	GE	43	53	38	47
6	GE	12	9	4	2
7	GE	6	6	6	16
8	GE	7	9	25	9
9	SH	40	37	35	27
10	SH	41	35	27	31
11	SH	35	26	26	18

NOTA: ALT aminotransferase de alanina; GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 16 – Dados referentes ao nível de fosfatase alcalina (em U/l)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	173	123	204	199
2	GE	80	72	61	155
3	GE	229	139	146	149
4	GE	195	220	187	236
5	GE	337	439	244	300
6	GE	30	20	13	6
7	GE	37	26	15	37
8	GE	30	52	112	40
9	SH	112	125	120	90
10	SH	160	146	112	145
11	SH	187	199	183	127

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 17 – Dados referentes ao nível de GGT (em U/l)

n	Grupo	B	AXC	5PR	T
1	GE	14	26	43	48
2	GE	16	34	11	30
3	GE	48	35	27	21
4	GE	43	39	24	27
5	GE	47	50	26	31
6	GE	13	9	7	5
7	GE	20	14	11	21
8	GE	6	10	21	9
9	SH	25	20	20	17
10	SH	17	17	14	14
11	SH	31	28	25	13

NOTA: GGT: gamaglutaminotransferase; GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; B: basal; AXC: clampeamento da aorta supracelíaca; 5PR: 5' pós-reperusão; T: término.

Tabela 18 – Dados referentes à análise histopatológica

n	Grupo	N	Ap	InfC	SiD	H	S	StM
1	GE	-	-	-	-	-	-	-
2	GE	-	-	-	-	-	-	-
3	GE	-	-	-	-	-	-	-
4	GE	-	-	-	-	-	-	-
5	GE	0	1	1	2	0	1	2
6	GE	0	1	2	2	0	1	2
7	GE	0	1	2	3	0	2	2
8	GE	2	2	2	3	1	2	3
9	SH	0	0	0	1	0	1	1
10	SH	0	0	1	1	0	1	1
11	SH	0	0	0	2	0	1	1

NOTA: GE: grupo experimento; SH: grupo SHAM; N: necrose hepatocelular; Ap: apoptose; InfC: infiltrado inflamatório; SiD: dilatação sinusoidal; H: hemorragia; S: balonização; StM: macroesteatose; 0: ausência de alteração; 1: alteração de leve intensidade; 2: alteração de moderada intensidade; 3: alteração de grave intensidade.

8. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Mokdad AA, Lopez AD, Shahrzaz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J, et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: A systematic analysis. *BMC Med.* 2014;
2. EASL. Hepamap: prospects for liver disease research in the EU. 2014; Available from:
http://www.easl.eu/medias/EASLimg/News/EASL_HEPAMAP_Full_Report.pdf
3. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Liver2 Transplantation-June 20-23, 1983. *Hepatology.* 1984;4(S1):107S–110S.
4. Todo S, Kam I, Lynch S, Starzl TE. Animal research in liver transplantation with special reference to the dog. Vol. 5, *Seminars in liver disease.* 1985. p. 309–17.
5. Goff BA. Changing the paradigm in surgical education. *Obstet Gynecol.* 2008 Aug;112(2 Pt 1):328–32.
6. Starzl TE. The saga of liver replacement, with particular reference to the reciprocal influence of liver and kidney transplantation (1955-1967). *J Am Coll Surg.* 2002;195(5):587–610.
7. Calne RY. Early days of liver transplantation. *Am J Transplant.* 2008 Aug 12;8(9):1775–8.
8. Zarrinpar A, Busuttil RW. Liver transplantation: past, present and future. Vol. 10, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* 2013. p. 434–40.
9. Starzl TE, Fung JJ. Themes of liver transplantation. Vol. 51, *Hepatology.* 2010. p. 1869–84.
10. Busuttil RW, De Carlis LG, Mihaylov P V., Gridelli B, Fassati LR, Starzl TE. The first report of orthotopic liver transplantation in the Western world. *Am J Transplant.* 2012;12(6):1385–7.
11. Staudacher V. [Transplantation of an organ with vascular anastomoses]. *Riforma Med.* 1952 Sep;66(39):1060.
12. Welch, CS. A note on transplantation of the whole liver in dogs. *Transpl Bull.* 1955;2:54–5.
13. Canon JA. Brief report. *Transpl Bull.* 1956;3:7.
14. Starzl TE, Bernhard VM, Benevenuto R, Cortes N. A new method for one-stage hepatectomy for dogs. *Surgery.* 1959 Nov;46:880–6.

15. Kaupp HAJ, Starzl TE. The use of an external bypass during experimental total hepatectomy. *Surgery*. 1960 Aug;48:330–1.
16. Starzl, T. E., Kaupp Jr., Harry A., Brock, Donald R., Lazarus, Robert E., Johnson R V. Reconstructive problems in canine liver homotransplantation with special reference to the postoperative role of hepatic venous flow. *Surg Gynecol Obs*. 1960;111:733–43.
17. Starzl TE, Kaupp HA, Brock DR, Butz GW, Linman JW. Homotransplantation of multiple visceral organs. *Am J Surg*. 1962;103(2):219–29.
18. Moore FD, Smith LL, Burnap TK, Dallenbach FD, Dammin GJ, Gruber UF, et al. One-stage homotransplantation of the liver following total hepatectomy in dogs. *Transpl Bull*. 1959;6(1):103–7.
19. Moore FD, Wheeler HB, Demissianos H V., Smith LL, Balankura O, Abel K, et al. Experimental whole-organ transplantation of the liver and of the spleen. *Ann Surg*. 1960 Sep;152(3):374–85.
20. Raffucci FL. The effects of temporary occlusion of the afferent hepatic circulation in dogs. *Surgery*. 1953 Mar;33(3):342–51.
21. Bergan J, Teixeira E, Yu H, Clarke W, Coburn M. Hyperkalemia accompanying canine portal venous occlusion. *Surgery*. 1968 Sep;64(3):629–33.
22. Moore FD, Birtch AG, Dagher F, Veith F, Krisher JA, Order SE, et al. Immunosuppression and vascular insufficiency in liver transplantation. *Ann N Y Acad Sci*. 1965;120(2):729–38.
23. Starzl TE, Marchioro TL, Porter KA. Progress in homotransplantation of the liver. *Adv Surg*. 1966;2:295–370.
24. Garnier H, Clot JP, Bertrand M, Camplez P, Kunlin A, Gorin JP, et al. [Liver transplantation in the pig: surgical approach]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 1965 May;260(21):5621–3.
25. Cordier G, Garnier H, Clot JP, Camplez P, Gorin JP, Clot P, et al. [Orthotopic liver graft in pigs. 1st results]. *Mem Acad Chir (Paris)*. 1966 Nov;92(27):799–807.
26. Calne R, White H, Yoffa D. Observations of orthotopic liver transplantation in the pig. *Br Med* 1967 May 20;2(May):478–80.
27. Mieny CJ, Moore AR, Homatas J, Eiseman B. Homotransplantation of the liver in pigs. *South African J Surg*. 1967;5(3):109–14.
28. Terblanche J, Peacock JH, Bowes J, Davies RP, Tierris EJ, Palmer DB, et al. The

- use of the pig as an experimental animal for orthotopic liver homotransplantation. *Br J Surg*. 1967;54(3):231.
29. Terblanche J, Peacock JH, Hobbs KE, Hunt AC, Bowes J, Tierris EJ, et al. Orthotopic liver homotransplantation: an experimental study in the unmodified pig. *S Afr Med J*. 1968 May;42(20):486–97.
 30. Oike F, Uryuhara K, Otsuka M, Dehoux JP, Otte JB, Lerut J, et al. Simplified technique of orthotopic liver transplantation in pigs. *Transplantation*. 2001 Jan;71(2):328–31.
 31. Adamesteanu C, Baba I, Gaboreanu M, Cozac G. Aspect anatomique et histologique du foie chez les porcelets. *Recl Med Vet l'Ecole d'Alfort*. 1968 Feb 9;144:141–9.
 32. Baulieux J, Berard P, Cret R, Lerat JL, Pouyet M. [The anatomy of pig-liver (*Sus scrofa domesticus*) (author's transl)]. *Arch Anat Histol Embryol*. 1972;55(2):209–31.
 33. Noldge GF, Priebe HJ, Kopp KH, Pelchen T, Riegel W, Geiger K. Differences in effects of isoflurane and enflurane on splanchnic oxygenation and hepatic metabolism in the pig. Vol. 71, *Anesth Analg*. 1990. p. 258–67.
 34. Guiney EJ, O'Connor JB, Fernando A, Healy B, Michaelowich B, Cahill J, et al. A technique of liver transplantation in the pig. *Ir J Med Sci*. 1974;143(1):255–63.
 35. Garnier H, Clot JP, Chomette G. Orthotopic transplantation of the porcine liver. *Surgery, Gynecol Obstet*. 1970 Jan;130(1):105–11.
 36. Calne RY, Binns RM, Millard PR, White HJO, Maginn RR, Yoffa DE, et al. Prolonged survival of liver transplants in the pig. *Br Med J*. 1967 Dec;4(5580):645–8.
 37. Calne RY, Yoffa DE, White HJ, Maginn RR. A technique of orthotopic liver transplantation in the pig. *Br J Surg*. 1968 Mar;55(3):203–6.
 38. Terblanche J, Peacock JH, Bowes J, Hobbs KEF. The technique of orthotopic liver homotransplantation in the pig. *J Surg Res*. 1968 Mar;8(4):151–60.
 39. Chilstrey LJ, Parbhoo SP, Tappin A, Baker GJ, Gracey LRH, Mullen PA, et al. Technique of orthotopic liver transplantation in the pig. *Br J Surg*. 1971 Aug;58(8):585–8.
 40. Delva E, Barberousse JP, Nordlinger B, Ollivier JM, Vacher B, Guilmet C, et al. Hemodynamic and biochemical monitoring during major liver resection with use

- of hepatic vascular exclusion. *Surgery*. 1984;95(3):309–18.
41. López-Santamaria M, Migliazza L, Gamez M, Murcia J, Paz Cruz JA, Muñoz J, et al. Supraceliac aortic clamping during the anhepatic phase of experimental orthotopic liver transplantation. *J Pediatr Surg*. 1999;34(9):1374–7.
 42. de Carlis L, Doglia M, Fassati LR, Rossi G, Tarenzi L, Galmarini D. Veno-venous bypass without heparin in orthotopic liver allotransplantation in the pig. *Int Surg*. 1986;71(2):76–8.
 43. Heuer M, Reinhardt R, Kneiseler G, Würzinger P, Zou X, Hua F, et al. Liver transplantation in swine without venovenous bypass. *Eur Surg Res*. 2010;45(1):20–5.
 44. Fondevila C, Hessheimer AJ, Flores E, Vendrell M, Muñoz J, Escobar B, et al. Step-by-step guide for a simplified model of porcine orthotopic liver transplant. *J Surg Res*. 2011;167(1).
 45. Goto S. [Orthotopic liver transplantation in miniature pigs: some technical considerations in recipient]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 1988 Feb;89(2):215–26.
 46. Leal A, Tannuri A, Belon A, Guimaraes R, Coelho M, Goncalves J, et al. A simplified experimental model of large-for-size liver transplantation in pigs. *Clinics*. 2013;68(8):1152–6.
 47. Sutherland LM, Middleton PF, Anthony A, Hamdorf J, Cregan P, Scott D, et al. Surgical simulation: a systematic review. Vol. 243, *Annals of Surgery*. 2006. p. 291–300.
 48. Badash I, Burt K, Solorzano CA, Carey JN. Innovations in surgery simulation: a review of past, current and future techniques. *Ann Transl Med*. 2016;4(23):453–453.
 49. Hammoud MM, Nuthalapaty FS, Goepfert AR, Casey PM, Emmons S, Espey EL, et al. To the point: medical education review of the role of simulators in surgical training. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2008.
 50. Golriz M, Hafezi M, Garoussi C, Fard N, Arvin J, Fonouni H, et al. Do we need animal hands-on courses for transplantation surgery? *Clin Transplant*. 2013;27(S25):6–15.
 51. Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Gartner JC, Zitelli BJ, Malatack JJ, et al. Evolution of liver transplantation. *Hepatology*. 1982;2(5):614–36.
 52. Stuart FP, Torres E, Hester WJ, Dammin GJ, Moore FD. Orthotopic

- autotransplantation and allotransplantation of the liver: functional and structural patterns in the dog. *Ann Surg.* 1967 Mar;165(3):325–40.
53. Dent DM, Hickman R, Uys CJ, Saunders S, Terblanche J. The natural history of liver alloone and autotransplantation in the pig. *Br J Surg.* 1971 Jun;58(6):407–13.
 54. Chaib E, Galvão FHF, Rocha-Filho JA, Silveira BL, Chen L, Carvalho MPDDC, et al. Total pancreatectomy: porcine model for inducing diabetes - anatomical assessment and surgical aspects. *Eur Surg Res.* 2011;46(1):52–5.
 55. Galvão FHF, Pompeu E, De Mello ES, Da Costa Lino Costa A, Mory E, Dos Santos RM, et al. Experimental multivisceral xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2008;15(3):184–90.
 56. Galvão FHF, Pompeu E, Panajotopoulos N, Santos VR, Bacchella T, Machado MCC. Orthotopic small intestine transplantation in dogs with systemic graft drainage. *Arq Gastroenterol.* 2005;42(3):182–5.
 57. Galvao FHF, Seid VE, Waisberg DR, Cruz RJJ, Hirano H, Catanozi S, et al. An innovative model of autologous anorectal transplantation with pudendal nerve reconstruction. *Clinics (Sao Paulo).* 2012 Aug;67(8):971–2.
 58. Galvao FHF, Soler W, Pompeu E, Waisberg DR, Mello ESD, Costa ACL, et al. Immunoglobulin G profile in hyperacute rejection after multivisceral xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2012;19(5):298–304.
 59. Machado MAC, Galvão FHF, Pompeu E, Ribeiro C, Bacchella T, Machado MCC. A canine model of laparoscopic segmental liver resection. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2004;14(5):325–8.
 60. Andraus W, Ejzenberg D, Santos R, Mendes L, Arantes R, Baracat E, et al. Sheep model for uterine transplantation: the best option before starting a human program. *Clinics.* 2017;72(3):178–82.
 61. Chatelain É. Vascularisation artérielle Et veineuse des organes digestifs abdominaux et de leurs annexes chez le porc (*Sus Scrofa Domesticus*). I. -- Artère coeliaque (a. Coeliaca). *Ann Rech Vétérinaires.* 1972;4(3):437–55.
 62. Gelman S, Khazaeli MB, Orr R, Henderson T. Blood volume redistribution during cross-clamping of the descending aorta. *Anesth Analg.* 1994;78(2):219–24.
 63. Kjekshus H, Risoe C, Scholz T, Smiseth OA. Regulation of hepatic vascular volume: contributions from active and passive mechanisms during catecholamine and sodium nitroprusside infusion. *Circulation.* 1997;96(12):4415–23.

64. Canedo LF, Machado MAC, Coelho AMM, Sampietre SN, Bacchella T, Machado MCC. Efeito protetor de antagonista das glicoproteínas IIb/IIIa nas alterações hepáticas e pulmonares secundárias à isquemia e reperfusão de fígado em ratos. *Arq Gastroenterol.* 2007;44(3):276–81.
65. Gruttadauria S, Marino G, Catalano F, Sgroi A V., Di Mauro GL, Basile F. Porcine orthotopic liver autotransplantation: facilitated technique. *J Investig Surg.* 2001;14(2):79–82.
66. Roveda L, Zonta A, Staffieri F, Timurian D, DiVenere B, Bakeine GJ, et al. Experimental modified orthotopic piggy-back liver autotransplantation. *Appl Radiat Isot.* 2009;67(7–8 SUPPL.).
67. Gringeri E, Polacco M, D'Amico FE, Scopelliti M, Bassi D, Bonsignore P, et al. A new liver autotransplantation technique using subnormothermic machine perfusion for organ preservation in a porcine model. In: *Transplantation Proceedings.* 2011. p. 997–1000.
68. Zammert M, Gelman S. The pathophysiology of aortic cross-clamping. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2016 Apr;30(3):257–69.
69. Stokland O, Molaug M, Thorvaldson J, Ilebekk A, Kiil F. Cardiac effects of splanchnic and non-splanchnic blood volume redistribution during aortic occlusions in dogs. *Acta Physiol Scand.* 1981 Oct;113(2):139–46.
70. Gelman S. The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. *Anesthesiology.* 1995 Apr;82(4):1026–60.
71. Cruz RJ, Poli De Figueiredo LF, Braz JLM, Diniz EA, Rocha E Silva M. Systemic and regional effects of supraceliac aortic occlusion during experimental hepatic vascular exclusion. *Am J Surg.* 2003;
72. Gelman S, Rabbani S, Bradley ELJ. Inferior and superior vena caval blood flows during cross-clamping of the thoracic aorta in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988;96(3):387–92.
73. Galvão FHF, de Andrade Júnior DR, de Andrade DR, Martins BC, Marson AG, Bernard CV, et al. Hepatocyte transplantation: State of the art. *Hepatol Res* [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2019 Jan 30];36(4):237–47. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386634606002798?via%3Dihub>
74. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion

- injury - A fresh look. *Experimental and Molecular Pathology*. 2003.
75. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: A tale of two deaths? *Hepatology*. 2006.
 76. Reiz S, Peter T, Rais O. Hemodynamic and Caxdiometabolic Effects of Infrarenal Aortic and Common Iliac Artery Declamping in Man—An Approach to Optimal Volume Loading. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1979;
 77. Nypaver TJ, Shepard AD, Reddy DJ, Elliott JP, Ernst CB. Supraceliac aortic cross-clamping: Determinants of outcome in elective abdominal aortic reconstruction. *J Vasc Surg*. 1993;
 78. Gertler JP, Cambria RP, Brewster DC, Davison JK, Purcell P, Zannetti S, et al. Coagulation changes during thoracoabdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg*. 1996;
 79. Anagnostopoulos P V., Shepard AD, Pipinos II, Raman SBK, Chaudhry PA, Mishima T, et al. Analysis of coagulation changes associated with supraceliac aortic crossclamping using thromboelastography. *J Surg Res*. 2001;
 80. Haithcock BE, Shepard AD, Raman SBK, Conrad MF, Pandurangi K, Fanous NH. Activation of fibrinolytic pathways is associated with duration of supraceliac aortic cross-clamping. *J Vasc Surg*. 2004;
 81. Cohen JR, Angus L, Asher A, Chang JB, Wise L. Disseminated Intravascular Coagulation as a Result of Supraceliac Clamping: Implications for Thoracoabdominal Aneurysm Repair. *Ann Vasc Surg*. 1987;
 82. Cohen JR, Schroder W, Leal J, Wise LM. Mesenteric shunting during thoracoabdominal aortic clamping to prevent disseminated intravascular coagulation in dogs. *Ann Vasc Surg*. 1988;
 83. Anagnostopoulos P V., Shepard AD, Pipinos II, Raman SBK, Chaudhry PA, Mishima T, et al. Hemostatic alterations associated with supraceliac aortic cross-clamping. *J Vasc Surg*. 2002;
 84. Cruz RJ, Garrido AG, Ribeiro CMF, Harada T, Rocha-e-Silva M. Regional Blood Flow Distribution and Oxygen Metabolism During Mesenteric Ischemia and Congestion. *J Surg Res*. 2010;
 85. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal Mucosal Lesion in Low-Flow States: I. A Morphological, Hemodynamic, and Metabolic Reappraisal. *Arch Surg*. 1970;

Apêndice

Received: 2014.10.23

Accepted: 2015.01.26

Published: 2015.XX.XX

Liver Autotransplantation in Pigs without Venovenous Bypass: A Simplified Model using a Supraceliac Aorta Cross-Clamping Maneuver

Authors' Contribution:

Study Design A

Data Collection B

Statistical Analysis C

Data Interpretation D

Manuscript Preparation E

Literature Search F

Funds Collection G

ABCDEFG **Bernardo F. Canedo**

ANCDEFG **Flavio H. Galvao**

BCDEFG **Liliana Ducatti**

BCDF **Lucas S. Nacif**

BDEF **Sergio Catanosi**

BCEF **Wangles V. Soller**

BDEF **Elazar Chaib**

ABCDEF **Luzi A. D'Albuquerque**

ABCDEFG **Wellington Andraus**

Department of Gastroenterology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, SP, Brazil

Corresponding Author: Flavio H. Galvao, e-mail: fg Alvao@usp.br

Source of support: Departmental sources

Background: The pig is an essential model for liver transplantation research and training. However, it develops hemodynamic instability during the anhepatic phase, requiring a short anhepatic phase or an extracorporeal circulation not appropriate for training purposes because it increases the risk of intraoperative complications. In this article we describe an economical and reproductive experimental model for training surgeon fellows in liver transplantation, without veno-venous bypass, using a supraceliac aortic cross-clamping maneuver.

Material/Methods: After liver liberation, we cross-clamped the supraceliac aorta and cross-clamped and divided the infrahepatic inferior vena cava (IVC), bile duct (BD), hepatic artery (HA), portal vein (PV), and suprahepatic IVC. We rapidly removed and flushed the liver *ex situ*, repositioned it orthotopically, and performed anastomosis in suprahepatic IVC, infrahepatic IVC and PV, reperfusion the liver. Lastly, we anastomosed the HA and BD. We also performed pulmonary artery catheter exams and recovery blood samples serially before and after graft reperfusion (beginning of anesthesia = basal; 5 min after reperfusion and 120 min after reperfusion = end-point) for hemodynamic and metabolic assessment.

Results: Transplantation fellows were able to perform the operations assisted by a senior surgeon. The median procedure time was 211 min (188–233 min). One pig died due to hemorrhage and 5 remained alive for up to 2 h after liver reperfusion, achieving at this time normal hemodynamic and metabolic parameters.

Conclusions: This model is suitable for training and experimentation, avoids venovenous bypass, is low cost, avoids immunological reaction, and prevents hemodynamic and metabolic complications.

MeSH Keywords: Liver Transplantation • Models, Theoretical • Swine

Full-text PDF: <http://www.annalsoftransplantation.com/abstract/index/idArt/892836>

1848

2

5

24

1 Background

Laboratory animal-based practice results in the improvement of surgical skills and the development of experimental models aimed toward new advances in this field. Liver transplantation training in animals improves surgeon perception of the techniques, reducing operation time and optimizing the learning curve [1].

Swine are prominent animal models for liver transplantation because of their significant physiological and anatomical similarity to humans [2,3]. However, these animals experience cardiocirculatory instability during hepatic vascular exclusion, requiring extracorporeal circulation, which increases the risk of intraoperative complications or fast vascular anastomosis for graft reperfusion, not appropriate for training purposes [2,4–8]. Furthermore, most swine models perform allograft orthotopic liver transplantation (OLT), which sacrifice 2 animals and require multiple surgeons and anesthetic teams, which is neither financially nor ethically suitable for surgical training.

Supraceliac aortic cross-clamping maneuver in swine models of allograft OLT is a relevant option to avoid major complications during the anhepatic phase due to hemodynamic instability [9–11]. In this study we describe a swine model of liver autotransplantation without venovenous bypass, using an aortic cross-clamping maneuver.

30 Material and Methods

Animals

We used 6 Large White pigs (4 male and 2 female) weighing 20–25 Kg. They received no food or water for 12 h prior to surgery. The Committee for Animal Care and Use of the University of Sao Paulo approved the experimental protocols and the pigs received appropriate care according to the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication 86-23, revised 1985).

Anesthesia

Premedication consisted of midazolam (0.5 mg/Kg i.m.) and ketamine (5 mg/Kg i.m.). A peripheral ear vein was cannulated and anesthesia was induced with propofol (5mg/Kg i.v.). Intubation was achieved with a 7.5 cuffed endotracheal tube and ventilation set at volume-controlled mode (8 mL/Kg). Anesthesia was maintained with isoflurane 2%, the analgesia with fentanyl (0.5 µg/Kg/min i.v.) and pigs were immobilized with pancuronium (0.1 mg/Kg followed by 1 mg/Kg/h i.v.). Sodium nitroprusside after aortic cross-clamping and

noradrenaline after reperfusion were administrated, depending on the hemodynamic status changes.

Vessels access and intraoperative monitoring

We performed a bilateral paratracheal incision in order to dissect the right internal jugular veins (IJV) to place a pulmonary artery catheter for hemodynamic assessment and the left IJV with urethral 12 catheter for fluid administration. We also dissected the internal carotid artery (ICA) for pressure assessment and blood samples. In order to prevent intraoperative hypothermia, a forced-air warming blanket was used.

Surgical technique

We performed a right-sided J-shaped incision to open the abdominal cavity, a cystostomy to quantify diuresis, and liver mobilization by dividing the left and right triangular ligament and retrohepatic membrane. We dissected the infrahepatic inferior vena cava (IVC) until both right and left renal veins and the portal triad structures in the hepatic hilum, including hepatic artery, biliary duct, and portal vein. To simplify the anastomosis, the arterial dissection went proximally to the celiac axis where the artery has a larger caliber. The suprahepatic IVC was not dissected since it is strongly attached to the diaphragm, preventing vascular injury (Figure 1A). Then, with the liver completely mobilized and the hepatic pedicle prepared, the abdominal supraceliac aorta was isolated and the cross-clamping maneuver was performed (Figure 1B, 1C). Subsequently, hepatic artery, portal vein, infrahepatic IVC, and suprahepatic IVC was carefully cross-clamped and divided, removing the graft and starting the anhepatic phase. We placed the graft in a recipient containing cold lactate ringer and flushed the portal vein, hepatic artery, and biliary duct with the same solution at 4°C until clean fluid drained from the vena cava (Figure 1C). Then we tailored the vessels – mainly the supra-hepatic vena cava (Figure 1D) – to facilitate the anastomosis.

We performed the suprahepatic IVC anastomosis with a running 4-0 polypropylene suture (Figure 2A), the infrahepatic IVC anastomosis with a running 5-0 polypropylene suture, and the portal vein anastomosis with a running 6-0 polypropylene suture (Figure 2B). We made “growth factor” at the infrahepatic IVC and portal vein anastomosis. Then we removed the clamps from the aorta, suprahepatic IVC, infrahepatic IVC, and portal vein, reperfusion the liver. Next, we performed the arterial anastomosis with a running 7-0 polypropylene suture (Figure 2B) and performed the biliary anastomosis with a running 6-0 polypropylene suture.

Euthanasia was achieved by 10 mL of 19.1% potassium chloride after propofol (5 mg/Kg) and fentanyl (5 µg/Kg) IV administration.

Figure 1. Hepatectomy – (A): Suprahepatic inferior vena cava isolation after incision of liver ligaments; (B): Hepatic hilum dissection and isolation of hepatic artery (HA), portal vein (PV) and biliary duct (BD); (C): Supraceliac aortic isolation; (D): Back-table graft perfusion.

Figure 2. Vascular reconstructions – (A): Supra-hepatic inferior vena cava (SHIVC); (B): Portal vein anastomosis (PV) and infra-hepatic inferior vena cava anastomosis (IHIVC) after both "growth factor" expansion.

Experimental design

The values for heart rate (HR), mean arterial pressure (MAP), central venous pressure (CVP), end tidal CO₂ (EtCO₂), and blood

samples were collected at 4 standardized time points: at the beginning of the anesthetic procedure (Baseline), during aortic clamping right before graft revascularization (Ao clamp), 5 min after graft revascularization (5' pos-revasc), and 120 min after

Table 1. Hemodynamic data during the experiment.

	Basal	Ao Clamp	5' Pos-revasc	End	p-value
HR (bts/min)	106.00±11.53	187.33±10.60	165.67±26.84	168.00±20.30	a: 0.012 b: 0.047 c: 0.010
MAP (mmHg)	86.00±13.00	82.00±25.24	79.33±17.93	71.33±10.07	a: 0.58 b: 0.63 c: 0.81
CVP (cmH ₂ O)	8.33±2.31	8.00±1.00	12.67±4.62	9.33±1.53	a: 0.57 b: 0.12 c: 0.34
EtCO ₂ (mmHg)	40.00±4.55	27.00±13.49	39.33±5.79	34.33±0.47	a: 0.86 b: 0.54 c: 0.92
Diuresis (mL/Kg/min)			3.29±1.14		

HR – heart rate; MAP – mean arterial pressure; CVP – central venous pressure; EtCO₂ – end tidal CO₂. p-values: a=basal × Ao, b=basal × 5' Pos-revasc and c=basal × End.

Figure 3. Hemodynamic parameters during the experiment.

reperfusion, immediately before euthanasia (End). Blood was also collected at the same previously described time points to evaluate the urea, creatinine, sodium, potassium, lactate, pH, bicarbonate, base excess, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT). Urine output was quantified at the end of the experiment.

The results are expressed as means ± standard deviation. For statistical purposes, Student's t-test was employed. P-values: a=basal X Ao, b=basal X 5' and c=Basal X End. A p-value <0.05 was considered significant.

Results

Transplantation follows from our liver transplantation program performed all operations, assisted by a senior surgeon. One animal died during the procedure because of technical failure

Figure 4. Lactate level during the experiment. p-value compared "5' Pos-revasc" versus "End".

(hemorrhage) and the 5 remaining pigs were kept alive for up to 2 hours after liver reperfusion.

Operative time was 210.68±18.95 min. Warm ischemic and aortic cross-clamping times were 46.33±7.39min and 47.60±7.89 min, respectively. The warm ischemic time and the anhepatic period were similar in this experimental model.

Hemodynamic data

Hemodynamic data at standardized times are presented in Table 1. A significant increase was observed in HR from aortic cross-clamping maneuver and forward. The MAP, CVP, and EtCO₂ maintained stable with no significant difference during the whole procedure (Figure 3). The mean of urine output was 3.29±1.14 mL/Kg/h.

Table 2. Serum analysis results during the experiment.

	Basal	Ao Clamp	5' Pos-revasc	End	p-value
Urea (dL/mL)	14.60±4.39	15.40±4.93	14.20±3.90	18.40±2.88	a: 0.40 b: 0.56 c: 0.074
Creatinine (dL/mL)	0.98±0.25	0.98±0.39	0.98±0.32	1.2±0.34	a: NS b: NS c: 0.13
Na (mEq/L)	139.60±9.50	141.60±17.27	139.20±14.04	133.80±2.68	a: 0.42 b: 0.52 c: 0.86
K (mEq/L)	4.04±0.37	4.14±0.77	5.22±0.68	4.38±0.45	a: 0.40 b: 0.008 c: 0.11
pH	7.38±0.07	7.51±0.05	7.06±0.05	7.30±0.24	a: 0.0037 b: 0.99 c: 0.73
Lactate (mg/dL)	18.40±6.31	34.20±10.99	94.80±17.05	64.20±12.91	a: 0.018 b: 0.0001 c: 0.0002
HCO ₃ (mmol/L)	28.60±2.03	22.94±2.07	15.54±2.43	17.52±2.78	a: 0.99 b: 0.99 c: 0.99
BE (mmol/L)	3.74±	0.12±1.76	-10.00±4.75	-9.52±3.82	a: 0.99 b: 0.99 c: 0.99
AST (IU/L)	89.60±54.61	112.60±67.80	153.60±97.73	240.00±95.92	a: 0.28 b: 0.13 c: 0.012
ALT (IU/L)	43.00±15.41	37.80±15.16	37.20±13.48	46.40±7.67	a: 0.69 b: 0.73 c: 0.34

Na – sodium; K – potassium; HCO₃ – bicarbonate; BE – base excess; AST – aspartate aminotransferase; ALT – alanine aminotransferase.
p-values: a=basal × Ao, b=basal × 5' and c=Basal × End.

Serum analysis

Table 2 shows the serum analysis levels at standardized times. Significant increases in pH and potassium values were seen at anhepatic phase and after reperfusion, respectively. Lactate level increased significantly in all periods, with a significant trend to clearance after reperfusion (Ao clamp: 94.80±17.05 mg/dL; 5' Pos-revasc: 64.20±12.91 mg/dL; *p*=0.011) (Figure 4). There was no significant difference regarding the renal function and sodium, bicarbonate, and base excess levels over the course of the experiment. “End” AST level was significantly increased over “Baseline” and no significant difference was seen in ALT levels.

Discussion

Animal-based training allows surgeons to learn in a low-stress environment where mistakes are tolerable and the procedures

can be repeated to improve the trainee’s surgical abilities and competency [1,12]. Although the initial liver transplantation studies involved dogs, experiments using pigs became the preferred large animal model because of their physiological and anatomical similarity to humans [2,3,13]. However, when subjected to hepatic vascular exclusion, pigs present hemodynamic instability marked by reduction of cardiac preload and a decrease of 50–60% systolic arterial blood pressure because of few naive portosystemic shunts and no azygous vein [8,14]. In an attempt to avoid this cardiac impact, extracorporeal circulation was used in the recipient operation, although it increases the risk of intraoperative complications like bleeding, coagulation disorder, and gas embolism [2,5,8,15]. More recently, allograft OLT models without veno-venous bypass were reported in order to prevent those complications. Nevertheless, a short anhepatic period of less than 30 min is an important factor for animal survival, requiring well-trained anesthetic and surgical teams, which impair liver transplantation training.

PROOF © INTERNATIONAL SCIENTIFIC INFORMATION

Figure 5. Section of suprahepatic IVC – Line (A) represents the level of section of the anterior face, toward the liver, and (B) the level of section of the posterior face, toward the vascular clamp.

An aortic cross-clamping maneuver was previously tested in swine, resulting in excellent hemodynamic stability during the anhepatic phase and becoming an option to avoid extracorporeal bypass complications [9–11]. However, for training purposes, allograft experimental models seem to be neither ethical nor financially appropriate, as 2 animals are used. To the best of our knowledge, this is the first description of a liver autotransplantation model in swine without veno-venous bypass, using an aortic cross-clamping maneuver. Thus, the current model is simpler, less expensive, and more ethical than the allograft OLT model because it utilizes only 1 animal.

The liver autotransplantation technique in swine is quite similar to the allotransplantation technique except for the length of the vessels to be anastomosed, which is shorter in the autograft model. Extra care must be taken in the section of the vessels, particularly in the suprahepatic IVC. We recommend that the anterior face section should be done toward the liver and the posterior section toward the vascular clamp in order to facilitate reconstruction (Figure 5). Furthermore, in attempting to make the autograft model feasible for training purposes, we performed the supraceliac aortic cross-clamping maneuver, which avoided hemodynamic instability and allowed more time to perform the vascular reconstructions without hemodynamic instability. Indeed, this maneuver enabled longer operation and anhepatic periods with minimal acid-base disorder and without rushing the transplantation fellow.

The actual model might be useful as an experimental model, as the restoration of liver function was noticed by the significant trend to lactate clearance. Also, the supraceliac aortic cross-clamping maneuver in this model was safe. Thus, it could

be useful for ischemic-reperfusion injury studies, as well as a negative control group for experiments assessing acute cellular rejection and graft tolerance since there is no isogenic pig to perform syngeneic transplantation. Moreover, this model may allow hepatocyte autotransplantation experiments, avoiding rejection by performing liver resection in the back table to process the hepatocyte and re-infuse it into the recipient, as described for islet cell transplantation by Chaib et al. [16,17].

Perioperative coagulopathy and bleeding is a major cause of early death following descending thoracic and thoracoabdominal aneurysm repairs [18,19]. A 60-min supraceliac aortic cross-clamping in porcine models is associated with clotting factor consumption and fibrinolytic system upregulation, most likely related to visceral ischemia [20,21]. Indeed, Cohen, et al. [22] documented in a canine model that continuous arterial perfusion of the superior mesenteric artery prevented the hemostatic alterations associated with supraceliac aortic cross-clamping. However, Cruz et al. [23] demonstrated in a dog model that supraceliac aortic cross-clamping does not worsen the already-compromised splanchnic perfusion during hepatic vascular exclusion, as assessed by measurement of gastric mucosal PCO_2 , PCO_2 -gap (difference between gastric mucosal and arterial PCO_2), gastric intramucosal pH, and splanchnic O_2 extraction. Furthermore, the systemic and regional metabolic changes are more pronounced and detected earlier in dogs subjected to superior mesenteric vein cross-clamping than to superior mesenteric artery cross-clamping [24]. Moreover, the hepatic vascular exclusion causes bowel edema, decreasing the surgical field. In this regard, supraceliac aortic cross-clamping maneuver avoids bowel edema, enlarging the surgical field and facilitating the procedure.

Conclusions

Liver autotransplantation using supraceliac aortic cross-clamping maneuver in swine is an excellent model for surgical training and research. It has the advantage of being simple, reproducible, and avoids veno-venous complications, preventing hemodynamic drawbacks with minor metabolic disturbance. Further, it is less expensive and more ethical than allograft models. It is also an appropriate model for experiments in ischemic-reperfusion injury, preservation solution analysis, and hepatocytes autotransplantation studies.

Acknowledgments

We thank Alessandra Crescenzi, Andreza Moraes, Cinthia Lanchotte, and Genivaldo Silva for their assistance during the surgery and John Neto Zelen Galvao for his English assistance.

1 References:

1. Goff BA: Changing the paradigm in surgical education. *Obstet Gynecol*, 2008; 112(2 Pt 1): 328–32
- 5 2. Calne RY, Yoffa DE, White HJ, Maginn RR: A technique of orthotopic liver translatation in the pig. *Br J Surg*, 1968; 55(3): 203–6
3. Cordier G, Garnier H, Clot JP et al: [Orthotopic liver graft in pigs. 1st results]. *Mem Acad Chir (Paris)*, 1966; 92(27): 799–807 [in French]
4. Garnier H, Clot JP, Chomette G: Orthotopic transplantation of the porcine liver. *Surg Gynecol Obstet*, 1970; 130(1): 105–11
- 10 5. Terblanche J, Peacock JH, Bowes J, Hobbs KE: The technique of orthotopic liver homotransplantation in the pig. *J Surg Res*, 1968; 8(4): 151–60
6. Fondevila C, Hessheimer AJ, Flores E et al: Step-by-step guide for a simplified model of porcine orthotopic liver transplant. *J Surg Res*, 2011; 167(1): e39–45
7. Heuer M, Reinhardt R, Kneiseler G et al: Liver transplantation in swine without venovenous bypass. *Eur Surg Res*, 2010; 45(1): 20–25
- 15 8. Oike F, Uryuhara K, Otsuka M et al: Simplified technique of orthotopic liver transplantation in pigs. *Transplantation*, 2001; 71(2): 328–31
9. Goto S: [Orthotopic liver transplantation in miniature pigs: some technical considerations in recipient]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*, 1988; 89(2): 215–26 [in Japanese]
- 20 10. Lopez-Santamaria M, Migliazza L, Gamez M et al: Supraceliac aortic clamping during the anhepatic phase of experimental orthotopic liver transplantation. *J Pediatr Surg*, 1999; 34(9): 1374–77
- 21 11. Leal AJ, Tannuri AC, Belon AR et al: A simplified experimental model of large-for-size liver transplantation in pigs. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013; 68(8): 1152–56
12. Golriz M, Hafezi M, Garoussi C et al: Do we need animal hands-on courses for transplantation surgery? *Clin Transplant*, 2013; 27(Suppl.25): 6–15
- 25 13. Goodrich EO Jr, Welch HF, Nelson JA et al: Homotransplantation of the canine liver. *Surgery*, 1956; 39(2): 244–51
14. Delva E, Barberousse JP, Nordlinger B et al: Hemodynamic and biochemical monitoring during major liver resection with use of hepatic vascular exclusion. *Surgery*, 1984; 95(3): 309–18
- 5 15. Garnier H, Clot JP, Bertrand M et al: [Liver transplantation in the pig: surgical approach]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 1965; 260(21): 5621–23 [in French]
16. Galvao FH, de Andrade Junior DR, de Andrade DR et al: Hepatocyte transplantation: State of the art. *Hepatol Res*, 2006; 36(4): 237–47
17. Chaib E, Galvao FH, Rocha-Filho JA et al: Total pancreatectomy: porcine model for inducing diabetes – anatomical assessment and surgical aspects. *Eur Surg Res*, 2011; 46(1): 52–55
- 10 18. Gertler JP, Cambria RP, Brewster DC et al: Coagulation changes during thoracoabdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg*, 1996; 24(6): 936–43; discussion 943–45
19. Nypaver TJ, Shepard AD, Reddy DJ et al: Supraceliac aortic cross-clamping: determinants of outcome in elective abdominal aortic reconstruction. *J Vasc Surg*, 1993; 17(5): 868–75; discussion 875–76
- 15 20. Anagnostopoulos PV, Shepard AD, Pipinos II et al: Analysis of coagulation changes associated with supraceliac aortic crossclamping using thromboelastography. *J Surg Res*, 2001; 98(1): 52–58
21. Haitcock BE, Shepard AD, Raman SB et al: Activation of fibrinolytic pathways is associated with duration of supraceliac aortic cross-clamping. *J Vasc Surg*, 2004; 40(2): 325–33
22. Cohen JR, Schroder W, Leal J, Wise L: Mesenteric shunting during thoracoabdominal aortic clamping to prevent disseminated intravascular coagulation in dogs. *Ann Vasc Surg*, 1988; 2(3): 261–67
23. Cruz RJ Jr, de Figueiredo LF, Braz JL et al: Systemic and regional effects of supraceliac aortic occlusion during experimental hepatic vascular exclusion. *Am J Surg*, 2003; 185(4): 388–93
- 25 24. Cruz RJ Jr, Garrido AG, Ribeiro CM et al: Regional blood flow distribution and oxygen metabolism during mesenteric ischemia and congestion. *J Surg Res*, 2010; 161(1): 54–61