RUBENS MACEDO ARANTES JUNIOR

Descrição da técnica de revascularização sequencial do enxerto e comparação com a técnica simultânea em um modelo de autotransplante uterino em ovelhas

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Wellington Andraus

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2022

RUBENS MACEDO ARANTES JUNIOR

Descrição da técnica de revascularização sequencial do enxerto e comparação com a técnica simultânea em um modelo de autotransplante uterino em ovelhas

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Wellington Andraus

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Arantes Junior, Rubens Macedo
Descrição da técnica de revascularização sequencial do enxerto e comparação com a técnica simultânea em um modelo de autotransplante uterino em ovelhas / Rubens Macedo Arantes Junior. -- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Wellington Andraus.

Descritores: 1.Métodos 2.Ovinos 3.Transplante 4.Útero 5.Isquemia quente 6.Reperfusão

USP/FM/DBD-111/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIAS

Aos meus avós, que mesmo nas adversidades da vida, foram grandes exemplos de amor, fé e luta.

Meus pais Rubens e Josefa e meus irmãos Leandro e Pedro, minha família, meus exemplos de amor, caráter, luta e companheirismo, que sempre me apoiaram e possibilitaram que eu realizasse o meu sonho e chegasse até aqui.

Meu tio Gil, a quem eu tenho o privilégio de poder considerar meu segundo pai. Que participou de muitos dos momentos mais felizes da minha vida e quem me estendeu a mão nos momentos mais difíceis. E que foi fundamental para esta conquista.

Minha esposa Claudia, quem eu amo e admiro muito. Que me apoiou e me deu força nos momentos difíceis e nos momentos de dúvidas, com quem eu celebro as vitórias e conquistas e que também foi fundamental para esta conquista. E com quem eu construí a maior obra de nossas vidas, nossa família.

Aos meus filhos Enrico e Catarina que são o meu maior orgulho, onde eu recarrego minhas energias e a face mais pura e verdadeira do significado da palavra amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro de Albuquerque, que em um momento difícil na minha vida, acreditou em mim, me deu grandes oportunidades profissionais e de fazer parte de um grupo de excelência. Grande exemplo de líder, médico e ser humano. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Wellington Andraus, meu orientador e grande amigo. Outro grande exemplo de médico e ser humano. Que idealizou e me ajudou a realizar esta tese.

Aos médicos da Disciplina de Transplante de Órgão do Aparelho Digestivo, grandes amigos, com quem eu aprendo a cada dia e que contribuem para que o nosso trabalho, que pode ser árduo em alguns momentos, seja extremamente prazeroso e recompensador.

Ao Dr. Ryan Yukimatsu Tanigawa, pela excelência na análise histológica e que trouxe grande contribuição para este trabalho.

Ao Dr. Amadeu Batista Neto, companheiro de experimentos, que conduziu com grande carinho e habilidade a anestesia dos experimentos realizados.

Milena Froes, que me ajudou imensamente na árdua burocracia da busca de fomentos.

Vilma Libério, pelo grande auxilio em todos os passos operacionais para a realização dessa tese.

Jairo Marques Moreira, pelo auxilio na formatação desta tese.

A todos os funcionários do Laboratório de análise clinicas (LIM 37), que possibilitaram a realização dos experimentos e dessa tese.

A todos os funcionários da Disciplina de Transplante de Órgãos do Aparelho Digestivo pela amizade e colaboração diária.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVO 10

2.1 Objetivo primário 11

2.2 Objetivo secundário 11

3 MATERIAIS E MÉTODOS 12

3.1 Aspectos éticos 13

3.2 Financiamento do projeto 13

3.3 Casuística 13

3.4 Variáveis estudadas 14

3.4.1 Análise macroscópica 14

3.4.2 Análise Laboratorial 14

3.4.3 Análise histológica 15

3.5 Organograma 17

3.6 Procedimento pré-anestésico 18

3.7 Procedimento anestésico 18

3.8 Procedimento cirúrgico 19

3.9 Análise Estatística 21

4 RESULTADOS 22

4.1 Descrição da técnica de revascularização sequencial do enxerto uterino . 23

4.1.1 Descrição do procedimento cirúrgico 23

4.2 Comparação entre os grupos (revascularização sequencial e revascularização simultânea do enxerto uterino) 30

5 DISCUSSÃO 50

6 CONCLUSÃO 61

7 ANEXOS 63

Anexo A - Aprovação do CEUA. 64

Anexo B - Termo de Outorga e Aceitação de Auxílios. 65

Anexo C - Variáveis encaminhadas no banco de dados para análise, unidades de medida e tipo da variável 66

Anexo D - Variáveis criadas para a análise estatística. 68

Anexo E - Artigo publicado em revista indexada ao Pubmed. 69

8 REFERÊNCIAS 70

LISTA DE ABREVIATURAS

AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
CPK	Creatinofosfoquinase
DC	Débito cardíaco
DHL	Desidrogenase láctica
DP	Desvio Padrão
FC	Frequência cardíaca
FIV	Fertilização Invitro
IIQ	Intervalo interquartil
IFU	Infertilidade por fator uterino
MMF	Micofenolato mofetil
MRKH	Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser
PAM	Pressão arterial média
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SIR	Síndrome de isquemia e reperfusão
UTx	Transplante uterino
TAC	Tacrolimus
TIQ	Tempo de isquemia quente
VD	Veia Direita
VE	Veia Esquerda

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolos de imunossupressão no transplante uterino (indução, manutenção e tratamento de rejeição). 8
Tabela 2 - Definições histológicas para avaliação de lesão tecidual de isquemia e reperfusão dos enxertos uterinos. 16
Tabela 3 - Estatística descritiva da variável tipo de revascularização com o número de pacientes (N), porcentagem e intervalo de confiança (IC) de 95% por categoria. 30
Tabela 4 - Estatística descritiva dos tempos de cirurgia e isquemia de acordo com o tipo de revascularização. 30
Tabela 5 - Estatística descritiva da pressão arterial média em tempos T0, T1 e T2, de acordo com o tipo de revascularização. 31
Tabela 6 - Estatística descritiva da pressão arterial média em tempos 0, 1 e 2, de acordo com o tipo de revascularização. 32
Tabela 7 - Resultados da análise semelhante a ANOVA (ANOVA não paramétrica) das variáveis de interesse por tipo de revascularização. 32
Tabela 8 - Avaliação macroscópica da revascularização do enxerto uterino na técnica de revascularização simultânea. 35
Tabela 9 - Avaliação macroscópica da revascularização do enxerto uterino na técnica de revascularização sequencial. 35
Tabela 10 - Estatística descritiva das variáveis qualitativas da avaliação macroscópica com o número de pacientes (N), porcentagem e intervalo de confiança (IC) de 95% por categoria. 37
Tabela 11 - Frequência das variáveis de reperfusão sanguínea em análise macroscópica por tipo de revascularização, com teste estatístico de associação (qui-quadrado). 38
Tabela 12 - Estatística descritiva do parâmetro hematológico AST (lados direito e esquerdo em tempos 0, 1 e 2), de acordo com o tipo de revascularização. 38
Tabela 13 - Estatística descritiva do parâmetro hematológico CPK (lados direito e esquerdo em tempos 0, 1 e 2), de acordo com o tipo de revascularização. 39
Tabela 14 - Estatística descritiva do parâmetro hematológico DHL (lados direito e esquerdo em tempos 0, 1 e 2), de acordo com o tipo de revascularização. 40

Tabela 15 - Estatística descritiva do parâmetro hematológico Lactato (lados direito e esquerdo em tempos 0, 1 e 2), de acordo com o tipo de revascularização. 41
Tabela 16 - Resultados da análise semelhante a ANOVA (ANOVA não paramétrica) das variáveis de interesse por tipo de revascularização e lado (esquerdo ou direito). 42
Tabela 17 - Estatística descritiva das variáveis qualitativas histológicas com o número de pacientes (N), porcentagem e intervalo de confiança (IC) de 95% por categoria. 46
Tabela 18 - Frequência das variáveis de análise histológica por tipo de revascularização, com teste estatístico de associação (qui-quadrado). 47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão geral de transecções, ligaduras e linhas de anastomose no transplante de útero. (A) Desenho esquemático das artérias (vermelho) e veias (azul) conectadas ao útero. As linhas de transecção são indicadas por linhas pretas. (B) O útero posicionado na pelve da receptora com anastomoses bilaterais término-laterais nos vasos ilíacos externos da receptora. 6
Figura 2 - Figura representativa da técnica cirúrgica do receptor do transplante de útero. 7
Figura 3 - Organograma representando as etapas do trabalho em ambos os grupos estudados. 17
Figura 4 - Animal em preparação anestésica para o procedimento cirúrgico. 19
Figura 5 - Incisão abdominal por laparotomia mediana. 23
Figura 6 - Avaliação inicial do enxerto uterino após exposição com o auxílio de compressas e afastador ortostático. 24
Figura 7 - Dissecção da artéria uterina, segmento da artéria ilíaca interna, veia uterina e ureter. 25
Figura 8 - Dissecção da artéria e veia ilíaca externa. 25
Figura 9 - Dissecção entre o útero e a bexiga. 26
Figura 10 - Dissecção e secção da cúpula vaginal. 26
Figura 11 - Na cirurgia de mesa, o enxerto uterino imerso em solução de ringer lactato gelado sendo preparado para o implante. 27
Figura 12 - Enxerto uterino sendo preparado na cirurgia de mesa para o implante. . 27
Figura 13 - Preparação da artéria uterina para o implante, mostrando o segmento da artéria ilíaca interna seccionado na face contralateral à emergência da artéria uterina, aumentando assim a área para realização da anastomose no momento do implante. 28
Figura 14 - Anastomoses da artéria e veia uterina. 29
Figura 15 - Enxerto sendo perfundido pela técnica de revascularização sequencial uterina. 29
Figura 16 - Tempo de isquemia quente (em minutos), por tipo de revascularização. 31

Figura 17 - Box-plot da Pressão Arterial Média (PAM), comparando as medianas e intervalo interquartil entre os grupos experimentais, em cada um dos tempos avaliados. 33
Figura 18 - Box-plot do Débito Cardíaco (DC), comparando as medianas e intervalo interquartil entre os grupos experimentais, em cada um dos tempos avaliados. 34
Figura 19 - Exemplo do aspecto da perfusão do útero (animal 5) na revascularização simultânea nos momentos inicial (19a), 30 segundos (19b) e 60 segundos (19c) após perfusão. Demonstrando o útero completamente perfundido no momento 30 segundos pós perfusão. 36
Figura 20 - Exemplo do aspecto da perfusão do útero (animal 02) na revascularização sequencial nos momentos inicial (20a), 30 segundos (20b) e 60 segundos (20c) após perfusão. Demostrando o útero completamente perfundido no momento 30 segundos pós perfusão. 36
Figura 21 - Aspecto da perfusão do útero (animal 10) na revascularização sequencial nos momentos inicial (21a), 30 segundos (21b) e 60 segundos (21c) após a reperfusão do enxerto. Mostrando o útero parcialmente perfundido 30 segundos após a perfusão, e totalmente perfundido 60 segundos após reperfusão. 37
Figura 22 - Box plot dos valores medianos e intervalo interquartil de AST entre os lados, em cada um dos tempos medidos, agrupados pelo tipo de revascularização. 43
Figura 23 - Box plot dos valores medianos e intervalo interquartil de CPK entre os lados, em cada um dos tempos medidos, agrupados pelo tipo de revascularização. 44
Figura 24 - Box plot dos valores medianos e intervalo interquartil de DHL entre os lados, em cada um dos tempos medidos, agrupados pelo tipo de revascularização. 44
Figura 25 - Box plot dos valores de Lactato entre os lados, em cada um dos tempos medidos, agrupados pelo tipo de revascularização. 45
Figura 26 - Biópsia de tecido uterino corado em hematoxilina e eosina mostrando edema intersticial. 48
Figura 27 - Biópsia de tecido uterino corado em hematoxilina e eosina mostrando Estase em capilar e reatividade endotelial. 48

Figura 28 - Biópsia de tecido uterino corado em hematoxilina e eosina mostrando estase sanguínea com rolamento de neutrófilos e reatividade endotelial e infiltrado neutrofílico no estroma. 49
Figura 29 - Biópsia de tecido uterino mostrando rolamento de neutrófilos. 49

RESUMO

Arantes Junior RM. *Descrição da técnica de revascularização sequencial do enxerto e comparação com a técnica simultânea em um modelo de autotransplante uterino em ovelhas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: O transplante uterino foi desenvolvido para o tratamento de pacientes portadoras de infertilidade por fator uterino exclusivo, e por se tratar de uma nova modalidade de transplante, ainda existe espaço para o seu aprimoramento técnico. Um fator que sabidamente impacta na sobrevida do enxerto em transplante de órgãos de uma maneira geral é o tempo de isquemia quente. No transplante de útero, especificamente, são realizadas pelo menos duas anastomoses vasculares de cada lado do útero e a revascularização do enxerto acontece, quando as pinças vasculares das artérias e veias são liberadas em ambos os lados, simultaneamente. Por este motivo é esperado que o tempo de isquemia quente no transplante uterino seja consideravelmente longo. **Objetivos:** O objetivo do trabalho foi descrever a técnica sequencial de revascularização do enxerto uterino, que tem o intuito de reduzir o tempo de isquemia quente do procedimento e compará-la com a técnica de revascularização simultânea. **Métodos:** Para o procedimento foi realizada a técnica de autotransplante uterino e foram utilizadas dez ovelhas adultas com cerca de 45kg, não prenhas, divididas em dois grupos: grupo de revascularização simultânea (5 animais) e grupo de revascularização sequencial do enxerto (5 animais). Para a avaliação dos grupos analisamos os tempos de procedimento e isquemia quente, a macroscopia do enxerto, além das análises hemodinâmica, laboratorial e histológica do útero. **Resultados:** No presente trabalho, foi descrito passo a passo a técnica de revascularização sequencial do enxerto uterino e demostrado ser esta factível e de fácil execução. Na comparação com a técnica simultânea, ambos os grupos tiveram tempo de procedimento cirúrgico semelhantes, e o tempo de isquemia quente foi significativamente menor no grupo de revascularização sequencial, com medianas de 32min no grupo sequencial versus 72min no simultâneo ($p = 0,008$). A macroscopia do enxerto e os parâmetros hemodinâmicos, laboratoriais e histológicos avaliados foram semelhantes entre os grupos estudados. **Conclusão:** A técnica de revascularização sequencial se mostrou factível e de fácil execução e reduziu de

forma significativa o tempo de isquemia quente no modelo de autotransplante uterino em ovelhas, sem comprometer a viabilidade do enxerto.

Descritores: Métodos; Ovinos; Transplante; Útero; Isquemia quente; Reperfusão.

ABSTRACT

Arantes Junior RM. *Sequential graft revascularization technique description and comparison with the simultaneous technique in a sheep model of uterine auto transplantation* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Introduction: Uterine transplantation was developed for the treatment of exclusive uterine factor infertility, and as it is a new modality of transplantation, there is still room for technical improvement. A factor that impacts graft survival in organ transplantation is the warm ischemia time. In uterine transplantation specifically, at least two vascular anastomoses are performed on each side of the uterus and the graft revascularization takes place when the vascular clamps of the arteries and veins are released on both sides simultaneously. For this reason, the warm ischemia time in the uterine transplant is expected to be considerably long. **Objectives:** The purpose of this study was to describe a sequential technique of uterine graft revascularization, which aims to reduce the warm ischemia time of the procedure and to compare it with the simultaneous revascularization technique. **Methods:** For the procedure, the uterine auto transplantation technique was performed using ten non-pregnant adult ewes, weighing about 45kg and divided in two groups: simultaneous revascularization group (5 animals) and sequential graft revascularization group (5 animals). To evaluate the groups, we analyzed the procedure and warm ischemia times, graft macroscopy, hemodynamic, laboratory and histological parameters of the uterus. **Results:** The technique of sequential revascularization of the uterine graft was described step by step and demonstrated to be feasible and easy to perform. In comparison with the simultaneous technique, the groups had similar surgical procedure times and the warm ischemia time was significantly shorter in the sequential revascularization group, with medians of 32min in the sequential group versus 72min in the simultaneous (p.0.008). The graft macroscopy and hemodynamic, laboratory and histological parameters evaluated were similar between the groups. **Conclusion:** The sequential revascularization technique proved to be feasible and easy to perform and efficiently reduced the warm ischemia time in the sheep uterine auto transplantation model, without compromising graft viability.

Descriptors: Methods; Sheep; Transplantation; Uterus; Warm ischemia; Reperfusion.

1 INTRODUÇÃO

O transplante uterino (UTx) foi desenvolvido para o tratamento de pacientes portadoras de infertilidade por fator uterino exclusivo, sem possibilidade de correção cirúrgica e que desejam engravidar.[1] As outras opções para essas pacientes atingirem a maternidade são a gestação por útero de substituição (US) e a adoção, porém, em nenhuma dessas opções a paciente tem a possibilidade de conceber.[2]

Segundo a Organização Mundial da Saúde, infertilidade é a incapacidade de um casal alcançar a concepção ou levá-la a termo após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares e sem proteção.[3] Estima-se que a infertilidade afeta entre 8 e 12% dos casais em idade reprodutiva em todo o mundo.[4]

A Infertilidade por fator uterino (IFU) é definida como uma condição infértil causada por problemas relacionados exclusivamente ao útero e pode ser classificada como congênita ou adquirida.[5] A IFU congênita inclui malformações uterinas, como útero arqueado e septado, útero unicorno, bicorno e didelfo e a síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH).[6] E a IFU adquirida é causada por histerectomias por tumor maligno do útero, incluindo câncer cervical e endometrial; doenças benignas, como miomas uterinos; adenomiose; pólipos endometriais; hemorragia pós-parto e a síndrome de Asherman ou aderência endometrial. A principal causa da IFU é a histerectomia devido a miomas uterinos.[7] A sua prevalência é de aproximadamente 3 à 5% da população em geral.[8]

Mulheres portadoras de IFU tem basicamente 3 opções para atingirem a maternidade: a gestação por US, a adoção e, mais recentemente, o UTx.[9]

Na Europa, o US não é oficialmente permitido na Áustria, Bulgária, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Itália, Malta, Noruega, Portugal, Espanha e Suécia. O US altruísta, mas não comercial, é permitido na Bélgica, Grécia, Holanda e Reino Unido. Alguns países europeus, como Polônia e República Tcheca, atualmente não têm leis que regulem essa prática.[10]

No Brasil, os casos de US são regidos pela Resolução nº 2.294/21 do Conselho Federal de Medicina: “A cedente temporária do útero deve ter ao menos um filho vivo e pertencer à família de um dos parceiros em parentesco consanguíneo até o quarto grau. Demais casos estão sujeitos a avaliação e autorização do Conselho Regional de Medicina. A cessão temporária do útero não poderá ter caráter lucrativo ou comercial e a clínica de reprodução não pode intermediar a escolha da cedente”.[11]

A adoção continua sendo um complexo processo administrativo, que pode ser bastante demorado e desgastante para os envolvidos. No Reino Unido, o processo de adoção pode levar até dois anos, sem a garantia de um desfecho bem sucedido.[12] Além disso, US e adoção não são soluções para mulheres que querem ter uma gestação.[13]

Um estudo francês mostrou que 20% das pacientes com IFU absoluta não consideravam adoção ou US, enquanto 60% mostraram interesse pelo UTx, apesar dos riscos e da incerteza quanto ao seu sucesso.[14]

Estudos também apontam que 90% das mulheres desejam ter filhos e a frustração deste objetivo pode trazer importantes consequências não só para as pacientes, como também para a sociedade. Casais inférteis apresentam maior incidência de transtornos ansiosos e depressivos, muitos destes com necessidade de tratamento, menor produtividade no trabalho e menores índices de qualidade de vida.[15–18]

Apesar da notável evolução alcançada na medicina reprodutiva nas últimas décadas, principalmente, com a introdução da fertilização in vitro no final da década de 70 e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides no início dos anos 90, esta se manteve praticamente estagnada quando se trata do tratamento de IFU.[19]Por muitos anos, o US e a adoção foram as únicas opções para mulheres portadoras desse tipo de infertilidade. Entretanto, mais recentemente, o UTx vem se mostrando uma opção de tratamento que proporciona o restabelecimento da fertilidade em pacientes portadoras dessa enfermidade.[2]

Os primeiros estudos experimentais em transplante de órgãos do aparelho reprodutor feminino, foram realizados nos anos 60.[20] Zhordania *et al.*, em 1964, realizaram o autotransplante de útero e ovários em ovelhas, através da técnica de omentopexia.[21] E pouco tempo depois, Eraslan *et al.* realizaram o autotransplante do útero e ovários com revascularização do enxerto através de anastomoses vasculares, sendo este o primeiro relato de reimplante útero-ovariano utilizando anastomoses vasculares, mostrando que o transplante útero-ovariano seria tecnicamente possível.[22]

Alguns outros trabalhos científicos ainda foram publicados nesse período, porém, o interesse no desenvolvimento de um modelo animal para o transplante de útero declinou de forma significativa após a metade dos anos 70, provavelmente, devido a problemas associados à imunossupressão disponível naquele momento e

também ao desenvolvimento do procedimento de fertilização in vitro para o tratamento da infertilidade por fator tubário. Poucos trabalhos são encontrados na literatura durante as décadas de 80 e 90 sobre transplante uterino.[23]

Em um período mais recente, no ano de 2002, Racho El-Akouri *et al.* desenvolveram um modelo animal em camundongos para estudar o processo de implante do enxerto uterino e a gestação, bem como a imunologia do transplante do útero, sendo este o primeiro relato de transplante de útero com funcionalidade comprovada em camundongos.[24] E em 2003, este mesmo grupo, demostrou que as taxas de gravidez e implantação de embrião e os pesos dos fetos e placentas, bem como o desenvolvimento pós-natal dos animais no útero transplantado, foram comparáveis ao grupo controle.[25]

O modelo animal utilizando ovelhas também se mostrou bastante importante no desenvolvimento do transplante uterino.[23] Nesse contexto, em 2010, Wranning *et al.* demonstraram a possibilidade de fertilidade e gravidez após o autotransplante do útero em um modelo animal de tamanho comparável ao humano.[26]

Já os estudos de UTx em primatas forneceram informações importantes para a aplicação clínica em humanos, devido às características anatômicas e também fisiológicas semelhantes aos humanos. Em 2012, Mihara *et al.*, relataram pela primeira vez, gravidez natural em primatas não humanos, após autotransplante uterino.[27]

A grande maioria, dos UTx realizados até a presente data, foram procedimentos realizados com doadores vivos.[2] A primeira tentativa de UTx na história recente foi um UTx com doador vivo, realizado por Fageeh *et al.*, no ano 2000 em Jeddah, Arábia Saudita. Uma doadora não relacionada na peri menopausa doou o útero à uma receptora submetida a histerectomia peri parto de emergência. O útero transplantado evoluiu com necrose secundária a trombose dos vasos uterinos e foi removido 99 dias pós UTx.[28]

Os nove casos seguintes foram realizados dentro do primeiro ensaio clínico em UTx, iniciado no ano de 2012 na Suécia. Foram incluídas oito receptoras portadoras da síndrome de MRKH e uma com histerectomia radical por câncer cervical. Sete das nove doadoras eram relacionadas. Cinco doadoras estavam na pós-menopausa e todas as doadoras tiveram apenas gestações não complicadas. Em 6 meses de acompanhamento, sete dos nove úteros ainda eram viáveis. As causas das duas

remoções dos enxertos uterinos foram trombose bilateral dos vasos uterinos e infecção intrauterina persistente, evoluindo para abscesso intrauterino.[29]

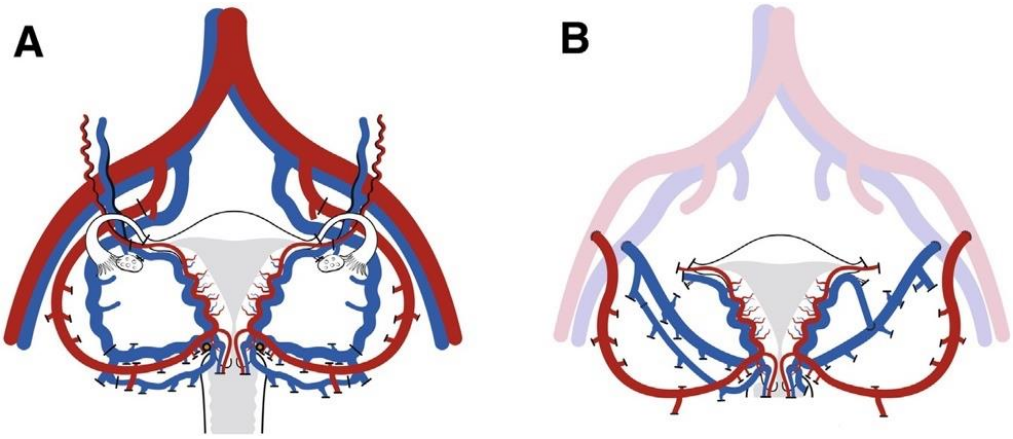
O primeiro nascimento ocorreu em setembro de 2014. A receptora era uma paciente portadora da síndrome MRKH e a doadora era não relacionada e tinha 61 anos de idade. Na 31ª semana de gestação, a mãe evoluiu com um quadro de pré-eclâmpsia e o parto cesárea foi realizado com sucesso.[30]

Quanto ao UTx com doador falecido o primeiro caso foi realizado na Turquia e publicado no ano de 2013. Uma mulher portadora da síndrome de MRKH, recebeu o útero de uma doadora nulípara de 22 anos com morte encefálica, vitima de um trauma. A paciente teve o primeiro ciclo menstrual 20 dias após o procedimento, porém, não existe relato de nascimento deste caso.[31]

O primeiro transplante uterino com doador cadáver com relato de nascimento, foi realizado em São Paulo, Brasil. Em setembro de 2016, uma mulher de 32 anos portadora de síndrome de MRKH foi submetida ao transplante uterino no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil. A doadora tinha 45 anos, antecedente de três partos vaginais e a causa da morte encefálica foi hemorragia subaracnóide. A primeira menstruação ocorreu 37 dias após o transplante, e regularmente (a cada 26-32 dias) a partir de então. A paciente engravidou após a primeira transferência de embrião, 7 meses após o transplante. Nenhum episódio de rejeição ocorreu durante a gestação. A cesárea foi realizada próximo a 36ª semana de gestação e a criança nasceu saudável com 2550g de peso. O útero foi removido no mesmo procedimento cirúrgico e a terapia imunossupressora foi suspensa. Sendo este o primeiro caso de nascido vivo após transplante de útero de um doador falecido no mundo.[32]

A cirurgia com doador vivo foi descrita por Brännström *et al.* em 2014. Utilizando uma incisão na linha média infra umbilical, o útero é dissecado e isolado junto com os ligamentos uterinos, que são importantes para sua fixação após o implante. A salpingectomia bilateral é realizada. Os vasos uterinos são cuidadosamente dissecados e separados dos ureteres. A vagina é seccionada de tal forma que o comprimento seja suficiente para anastomose no receptor e o enxerto é retirado (Figura 1).[29]

Figura 1 - Visão geral de transecções, ligaduras e linhas de anastomose no transplante de útero. (A) Desenho esquemático das artérias (vermelho) e veias (azul) conectadas ao útero. As linhas de transecção são indicadas por linhas pretas. (B) O útero posicionado na pelve da receptora com anastomoses bilaterais término-laterais nos vasos ilíacos externos da receptora.

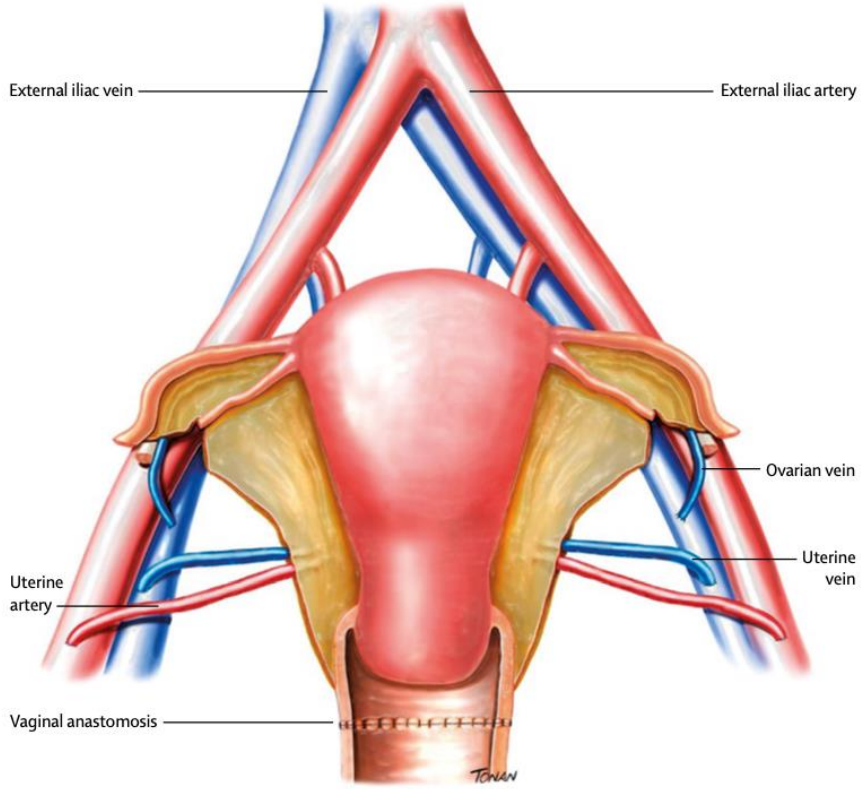


Fonte: Brännström *et al.*, 2014.[29]

Quanto aos doadores falecidos, são tipicamente doadores de múltiplos órgãos, e são submetidos a uma grande incisão na linha média com uma maior exposição dos órgãos. Como resultado, a captação do órgão pode ser menos restritiva, trazendo vasos mais longos, o que pode facilitar a reconstrução vascular. O útero, assim como os outros órgãos é heparinizado e perfundido com solução de preservação antes da retirada.[33]

É muito importante que os procedimentos do doador e do receptor sejam sincronizados para assim minimizar o tempo de isquemia do órgão. Na cirurgia do receptor o acesso é obtido através de uma incisão na linha média infra umbilical. O útero nativo, quando presente, é removido, e o local é então preparado para receber o novo órgão. Os vasos ilíacos são dissecados e isolados. O enxerto uterino é colocado em sua posição habitual na pelve e são realizadas as anastomoses vasculares entre os vasos uterinos do enxerto e os vasos ilíacos externos do receptor. Após o término das anastomoses vasculares de ambos os lados, o enxerto é revascularizado (Figura 2). A borda vaginal do enxerto é anastomosada à cúpula da vagina da receptora e o útero é fixado em sua localização pélvica através dos ligamentos uterinos.[31,32]

Figura 2 - Figura representativa da técnica cirúrgica do receptor do transplante de útero.



Fonte: Ejzenberg D *et al*., 2019.[32]

A terapia imunossupressora é habitualmente mantida até que o enxerto seja removido. Por esse motivo, as complicações que esta terapia pode causar para o desenvolvimento fetal devem ser ainda esclarecidas. De acordo com uma revisão sistemática da literatura sobre gravidez em pacientes submetidas a transplante de fígado e rim, aproximadamente 75% de todas as gestantes tiveram gestações bem-sucedidas. Malformações congênitas foram observadas em aproximadamente 3% de todas as mulheres grávidas transplantadas, taxa semelhante à da população de mulheres não transplantadas.[34]

A Tabela 1 mostra alguns dos protocolos de terapia imunossupressora em UTx, envolvendo indução e manutenção, utilizados até o momento.[35]

Tabela 1 - Protocolos de imunossupressão no transplante uterino (indução, manutenção e tratamento de rejeição).

Referência	Indução	Manutenção	Rejeição
Faggeh W. *et al.*, 2002[28]	Ciclosporina 6h antes da cirurgia e metilprednisolona 500mg.	Ciclosporina, azatioprina e prednisolona.	Timoglobulina, metilprednisolona, ciclosporina e azatioprina.
ErmanAkar M. *et al.*, 2013[36]	Timoglobulina e prednisolona.	TAC, MMF eprednisolona durante 12 meses. Então substituição do MMF por azatioprina.	Ajuste das doses de prednisolona e azatioprina.
Brannstrom M. *et al.*, 2014[29]	Timoglobulina, metilprednisolona 500mg e MMF 1g	TAC, MMF e corticoide.	Corticóide
Brannstrom M. *et al.*, 2015[30]	Timoglobulina imediatamente antes da cirurgia e 12h após e metilprednisolona 500mg.	TAC e MMF durante 6 meses. Então substituição do MMF por azatioprina e prednisolona.	Corticóide
Johannesson L. *et al.*, 2015[37]	Timoglobulina imediatamente antes da cirurgia e 12h após e metilprednisolona 500mg.	TAC e MMF durante 10 meses. Então substituição do MMF por azatioprina.	Corticóide e aumento da dose de TAC.

Fonte: Ejzenberg D *et al.*, 2016.[35]

Um dos fatores que sabidamente impactam na sobrevida do enxerto em transplante de órgãos é o tempo de isquemia quente (TIQ).[38,43,44] Ao consideramos a necessidade da realização de pelo menos quatro anastomoses vasculares, associado ao fato de serem anastomoses pequenas e delicadas e o enxerto só ser revascularizado após a realização das anastomoses de ambos os lados, é esperado que o TIQ no transplante de útero seja consideravelmente longo. Brannstrom *et al.*, no primeiro *trial* clinico em transplante uterino realizado, relatam um tempo médio de isquemia quente de 1h e 23min (+/-9min) nos procedimentos realizados.[29]

Apesar de não existirem estudos clínicos que avaliem o impacto do TIQ no enxerto uterino, em modelo animal Garcia *et al.* demostraram que os enxertos uterinos submetidos a um TIQ prolongado apresentaram alterações morfológicas muito mais intensas, demostrando que o tempo de isquemia quente estendido tem efeitos prejudiciais ao órgão.[41]

Por se tratar de uma nova modalidade de transplante, ainda existe espaço para o aprimoramento técnico do transplante uterino. Esse é o primeiro trabalho que descreve a técnica de revascularização sequencial do enxerto que tem como principal objetivo a redução do tempo de isquemia quente associado ao procedimento.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo primário

O objetivo primário foi descrever a técnica de revascularização sequencial do enxerto uterino, onde são realizadas as anastomoses vasculares da artéria e veia uterina de um lado do útero, o enxerto é revascularizado e posteriormente são realizadas as anastomoses vasculares contralaterais.

2.2 Objetivo secundário

Comparar a técnica de revascularização sequencial com a técnica de revascularização simultânea do enxerto uterino, onde a revascularização se dá após o término das anastomoses vasculares de ambos os lados do útero.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Todos os animais obtidos foram manipulados na FMUSP de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com a resolução no 714 de 20 de julho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) que regulamenta os procedimentos de eutanásia. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP sob numero 063/16 em 22.06.2016 (Anexo A) após ter sido aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Departamento de Gastrenterologia do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2 Financiamento do projeto

O projeto de pesquisa foi financiado através da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2017/05389-4, com período de vigência de 01/08/2018 à 31/07/2019 (Anexo B).

3.3 Casuística

Para este experimento foram utilizadas ovelhas adultas com peso de aproximadamente 45kg, não prenhas. Foi realizada a técnica de autotransplante uterino, isto é, remoção do útero preservando as suas estruturas anatômicas e implante no mesmo animal, porém, com revascularização do órgão por anastomoses vasculares em local diverso do original.

O experimento foi realizado no Laboratório de Investigação Médica 37 (LIM 37) de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Um total de dez animais foram utilizados e divididos em dois grupos:

- Grupo de revascularização simultânea do enxerto (SI), aonde as anastomoses vasculares (artérias e veias uterinas) foram realizadas dos dois lados do útero, iniciando-se pelo lado direito e a revascularização do enxerto realizada em ambos os lados simultaneamente.

- Grupo de revascularização sequencial do enxerto (SE), aonde foram realizadas primeiramente as anastomoses da artéria e veia uterina direita, o enxerto foi então revascularizado, para posteriormente serem realizadas as anastomoses da artéria e veia uterina esquerda.

3.4 Variáveis estudadas

Para a avaliação dos grupos foram realizadas as seguintes análises: tempo do procedimento e tempo de isquemia quente, avaliação hemodinâmica (pressão arterial media (PAM) e débito cardíaco (DC)), avaliação macroscópica do enxerto, avaliação laboratorial (Aspartato Aminotransferase (AST), Creatinofosfoquinase (CPK), Desidrogenase Láctica (DHL) e lactato), e a avaliação histológica do enxerto.

3.4.1 Análise macroscópica

A avaliação macroscópica do enxerto foi feita pelo cirurgião que realizou o procedimento, pelo primeiro auxiliar e pelo veterinário anestesista que acompanhou o procedimento, e foi levado em consideração a qualidade da perfusão do órgão através dos seguintes parâmetros: homogênea ou heterogênea, rápida (<=30 segundos) ou lenta (>30 segundos), unilateral ou bilateral.

3.4.2 Análise Laboratorial

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Análises Especiais do Laboratório de Investigação Médica 03 (LAE-LIM 03), Departamento de Patologia, sendo que para análise dos exames bioquímicos foi utilizado o aparelho Cobas C111 (ROCHE, Indianápolis, USA) e todos os kits utilizados nos exames foram da ROCHE (ROCHE, Indianápolis, USA), metodologia cinético UV. O exame de lactato foi realizado no aparelho ABL 800 FLEX (Radiometer, Copenhague, Dinamarca) metodologia eletrodos de íon seletivo.

As amostras de sangue total para análise laboratorial foram colhidas em 3 momentos durante o procedimento. Logo no início, após a abertura da cavidade abdominal (T0), imediatamente após a revascularização do enxerto (T1) e uma hora após a revascularização do enxerto (T2). A primeira amostra (T0), foi colhida através

do cateter venoso central e as duas outras amostras sanguíneas subsequentes (T1 e T2) foram colhidas das veias uterinas direita e esquerda e analisadas separadamente.

3.4.3 Análise histológica

A avaliação histológica do enxerto foi realizada por patologista do Departamento de Patologia do Hospital das Clinicas da FMUSP. As biopsias uterinas foram realizadas em ambos os lados do enxerto, no corpo uterino e nos mesmos tempos padronizados para a coleta de sangue para análise laboratorial, isto é, logo no início do procedimento, após a abertura da cavidade abdominal (T0), imediatamente após a revascularização do enxerto (T1) e uma hora após a revascularização do enxerto (T2).

Os fragmentos de tecido uterino, fixados em solução de formol a 2% e corados com hematoxilina e eosina, foram submetidos à análise histológica por microscopia óptica por patologista único, sem o conhecimento de qual grupo pertencia cada fragmento estudado.

As definições histológicas para avaliação de lesão tecidual de isquemia e reperfusão dos enxertos uterinos estão representadas a seguir (Tabela 2).

Tabela 2 - Definições histológicas para avaliação de lesão tecidual de isquemia e reperfusão dos enxertos uterinos.

1. Edema:

- Presente
- Ausente

2. Estase:

- Presente
  - Focal (<50%)
  - Difusa (>50%)
- Ausente

3. Necrose:

- Presente
  - Focal
  - Difusa
- Ausente

4. Apoptose:

- Presente
  - Focal
  - Difusa
- Ausente

5. Neutrófilos no tecido:

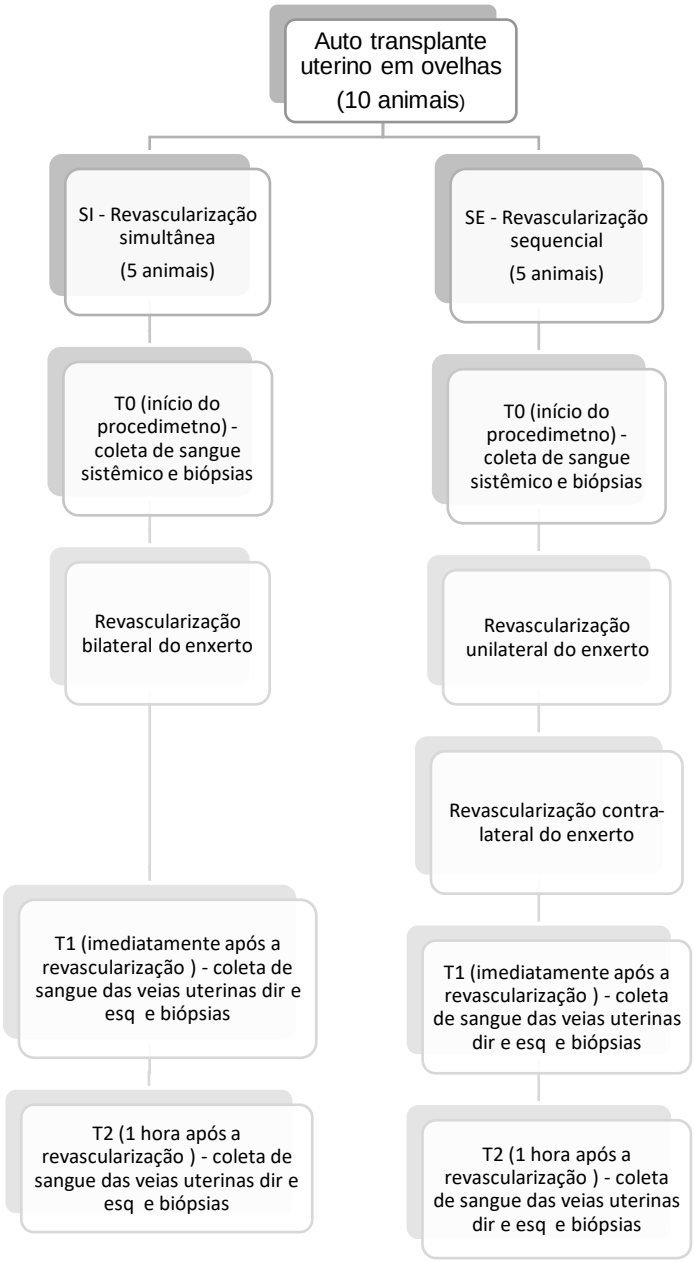
- Presente
- Ausente

Fonte: Zitkute *et al.,* 2020[42] e Dahm-Kähler *et al.,* 2008[43]

3.5 Organograma

Organograma demostrando a divisão dos grupos estabelecidos para comparação e as respectivas etapas do trabalho que foi realizado (Figura 3).

Figura 3 - Organograma representando as etapas do trabalho em ambos os grupos estudados.



Fonte: Produção do próprio autor.

3.6 Procedimento pré-anestésico

Antes da cirurgia, os animais permaneciam em jejum de 18 horas de alimentos sólidos e 6 horas de alimentos líquidos e recebiam medicação sedativa e ansiolítica pré-anestésica intramuscular com midazolam na dose de 0,5 mg/kg.

3.7 Procedimento anestésico

A indução anestésica foi realizada por via intravenosa com o uso de propofol na dose de 5 mg/kg e a intubação com sonda orotraqueal de tamanho apropriado de acordo com a avalição do anestesista veterinário (tamanho 7,5 mm ou 8 mm). A manutenção anestésica foi feita com a utilização isofluorano 1,5 % ofertado em 100% de oxigênio, fentanil em infusão continua na dose de 10ug/kg/min e bloqueio neuromuscular com pancurônio na dose de 0,05mg/kg. A ventilação mecânica foi realizada em volume controlado com 10mL/kg de volume corrente, ajustando-se a frequência respiratória para manter a concentração expirada de CO_2 ($ETCO_2$) entre 35 e 45 mmHg. A monitorização hemodinâmica foi feita com cateter de Swan-Ganz instalado na veia jugular do animal através da técnica de punção ou dissecção vascular, à critério do anestesista. Todo procedimento anestésico foi realizado e acompanhado por médico anestesista veterinário com experiência em cirurgia experimental (Figura 4).

Figura 4 - Animal em preparação anestésica para o procedimento cirúrgico.

Fonte: Produção do próprio autor.

3.8 Procedimento cirúrgico

O acesso abdominal foi através de laparotomia mediana e após abertura da cavidade eram avaliadas as estruturas viscerais e vasculares e o trato digestivo do animal mobilizado para melhor exposição da cavidade pélvica. Nesse momento foram realizadas as primeiras coletas de sangue para análise laboratorial e biópsias (T0).

Inicialmente o ligamento largo foi seccionado e posteriormente os vasos uterinos dissecados bilateralmente, assim como os vasos ilíacos externos, local este utilizado para o implante do enxerto. A bexiga e os ureteres foram dissecados e a cúpula vaginal identificada e seccionada e após a secção dos vasos uterinos o útero foi retirado.

Na cirurgia de mesa o enxerto foi resfriado e perfundido com aproximadamente 250ml de uma solução de Ringer Lactato gelado com 5000U de heparina não fracionada. A perfusão foi feita através das artérias uterinas, até que a solução retornasse completamente límpida pelas veias uterinas. Neste momento, as artérias uterinas e a porção distal das veias uterinas foram preparadas para o implante.

O enxerto uterino foi então colocado na cavidade pélvica e realizadas as anastomoses vasculares. Nos animais do grupo SI foram realizadas as anastomoses de ambos os lados e posteriormente o enxerto uterino foi revascularizado. Já nos animais do grupo SE, após as anastomoses vasculares do lado direito, foi realizada a reperfusão do enxerto e posteriormente foram realizadas as anastomoses vasculares do lado esquerdo do útero.

Imediatamente após a revascularização foram realizadas as coletas de sangue para análise laboratorial e biópsias (T1).

Posteriormente o enxerto foi fixado ao peritônio e a vagina suturada.

Uma hora após a revascularização do enxerto uterino foram realizadas as últimas coletas de amostra de sangue total para análise laboratorial e biópsias (T2).

Por fim, foram removidos os acessos vasculares e suturada a parede abdominal. Ao término do procedimento foi realizada a eutanásia do animal com aumento do vaporizador do isofluorano de 1,5% para 5 % e administração de cloreto de potássio intravenoso.

O animal foi colocado em saco plástico de material infectante, identificado com a espécie do animal, data, quantidade, clínica responsável e encaminhado para incineração na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.9 Análise Estatística

O banco de dados original foi organizado e tratado, com manutenção de 69 variáveis. Para análise, estão dispostos no Anexo C.

Foram criadas variáveis para transformar as variáveis de tempo (horas e minutos) em minutos e para calcular a diferença dos parâmetros entre o tempo 2 e o tempo 0 (Anexo D).

Todos os testes realizados levaram em consideração um α bidirecional (p-valor) de 0,05 e intervalo de confiança (IC) de 95%, realizados com apoio computacional dos softwares R ou IBM SPSS Statistics para Windows, versão 25 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA).

Os dados foram descritos com frequência e intervalo de confiança para variáveis qualitativas e com medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (desvio padrão, intervalo interquartil, mínimo e máximo) para dados quantitativos.

A escolha dos testes não paramétricos se deveu ao número de animais utilizados no experimento reduzir de forma significativa o poder de testes de normalidade, e por isso não ser adequada a sua utilização, optando-se por tratar os dados como não paramétricos.

A existência de associação entre as variáveis qualitativas e o tipo de revascularização foi avaliada com teste de qui-quadrado. A associação entre variáveis quantitativas e o tipo de revascularização foi avaliada com teste de Wilcoxon. A relação da variável tipo de revascularização com a tendência temporal das variáveis de interesse foram avaliadas através de teste estatístico semelhante a ANOVA (ANOVA não paramétrica), implementada no pacote nparLD, considerando a influência da variável “animal”, sempre que necessário (quando avaliados lados direito e esquerdo).

4 RESULTADOS

4.1 Descrição da técnica de revascularização sequencial do enxerto uterino (Anexo E).[44]

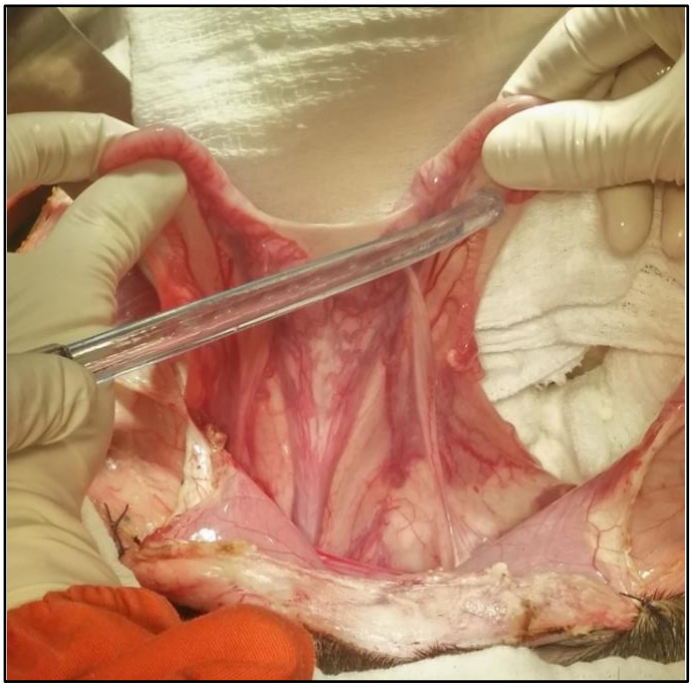
4.1.1 Descrição do procedimento cirúrgico

A via de acesso abdominal foi por laparotomia mediana (Figura 5). Após a abertura da cavidade, foram avaliadas as estruturas viscerais e vasculares e o trato digestivo do animal mobilizado cranialmente com o auxílio de compressas e afastador ortostático para melhor exposição da cavidade pélvica, do útero e suas estruturas vasculares (Figura 6).

Figura 5 - Incisão abdominal por laparotomia mediana.

Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 6 - Avaliação inicial do enxerto uterino após exposição com o auxílio de compressas e afastador ortostático.

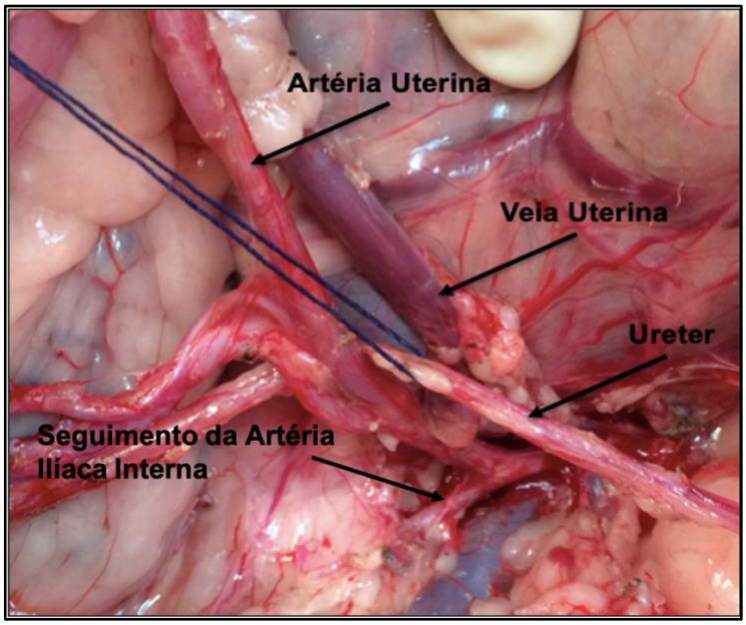


Fonte: Produção do próprio autor.

A seguir, foi realizada a secção do ligamento largo uterino e a dissecção da artéria uterina direita até a sua origem na artéria ilíaca interna direita. Um pequeno segmento da artéria ilíaca interna direita foi também dissecado proximal e distalmente à artéria uterina e utilizado posteriormente para facilitar a anastomose arterial no momento do implante do enxerto. Posteriormente, foi realizada a dissecção da veia uterina direita até cerca de 10cm de sua origem no corpo uterino (Figura 7).

Em seguida, os mesmos procedimentos foram realizados no lado contra lateral.

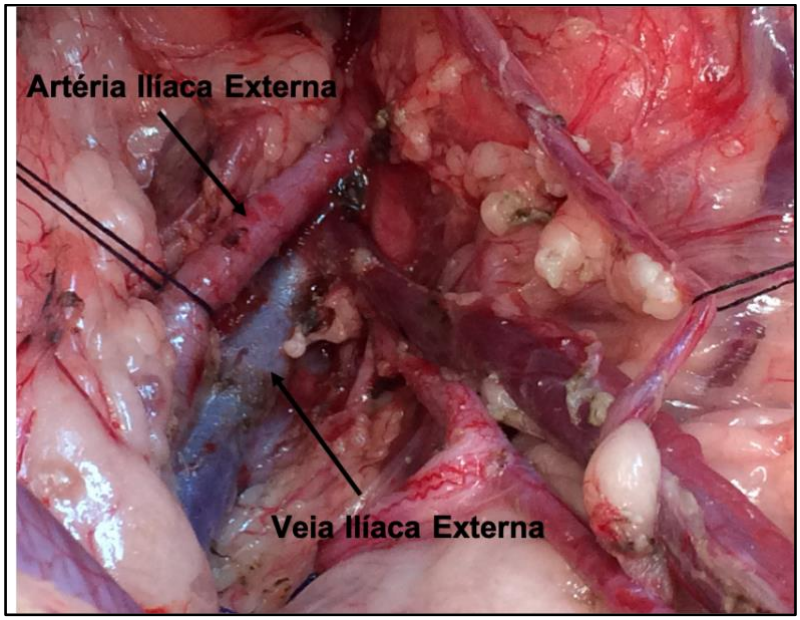
Figura 7 - Dissecção da artéria uterina, segmento da artéria ilíaca interna, veia uterina e ureter.



Fonte: Produção do próprio autor.

Após a preparação dos vasos uterinos, as artérias e veias ilíacas externas direita e esquerda foram dissecadas, local este utilizado para confecção das anastomoses vasculares e implante do enxerto uterino (Figura 8).

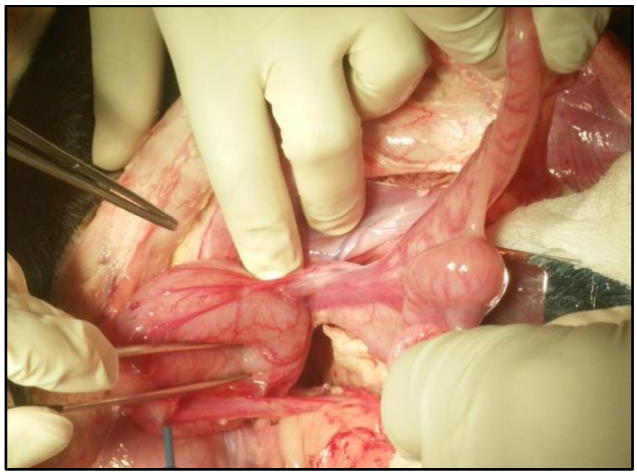
Figura 8 - Dissecção da artéria e veia ilíaca externa.



Fonte: Produção do próprio autor.

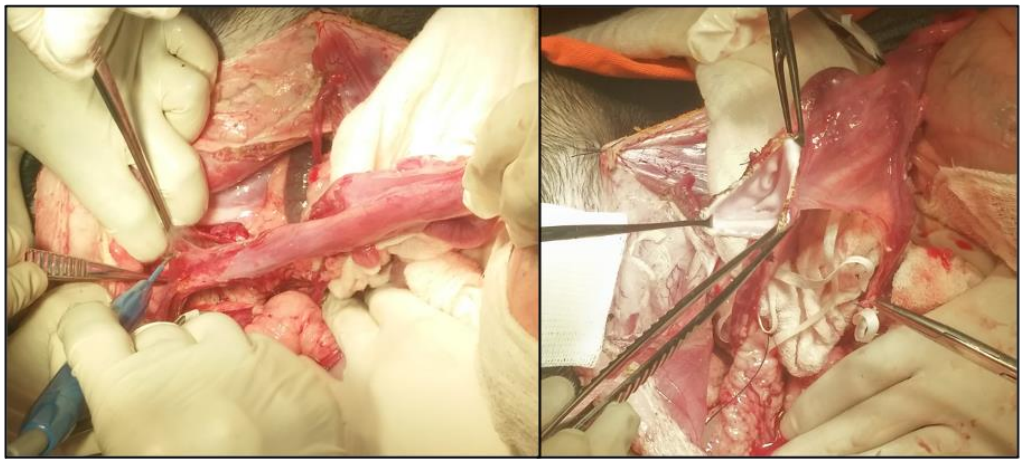
Posteriormente, a bexiga e os ureteres foram dissecados (Figura 9) e a cúpula vaginal identificada e seccionada com o auxilio do eletrocaltério (Figura 10).

Figura 9 - Dissecção entre o útero e a bexiga.



Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 10 - Dissecção e secção da cúpula vaginal.



Fonte: Produção do próprio autor.

Foi realizado então o clampeamento, ligadura (com fio de algodão nº 3.0) e secção dos vasos uterinos previamente dissecados e o útero retirado e colocado em solução gelada de ringer lactato.

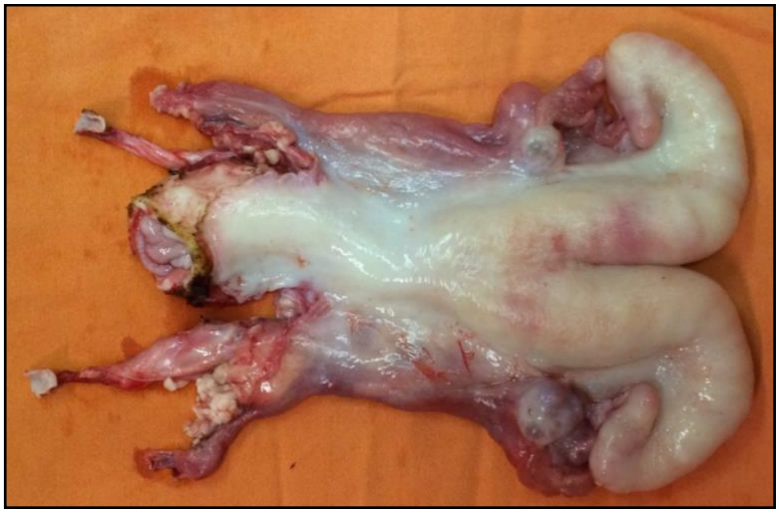
Na cirurgia de mesa o enxerto foi resfriado e perfundido com aproximadamente 250ml de uma solução de Ringer Lactato gelado com 5000U de heparina não fracionada (Figura 11).

Figura 11 - Na cirurgia de mesa, o enxerto uterino imerso em solução de ringer lactato gelado sendo preparado para o implante.

Fonte: Produção do próprio autor.

A perfusão foi feita através das artérias uterinas direita e esquerda, até que a solução retornasse completamente límpida pelas veias uterinas. Neste momento, as artérias uterinas e a porção distal das veias uterinas foram preparadas para o implante (Figura 12). O segmento da artéria ilíaca interna que foi retirado junto à artéria uterina foi então seccionado na face contralateral à emergência da artéria uterina, aumentando-se assim a área para realização da anastomose no momento do implante (Figuras 13).

Figura 12 - Enxerto uterino sendo preparado na cirurgia de mesa para o implante.



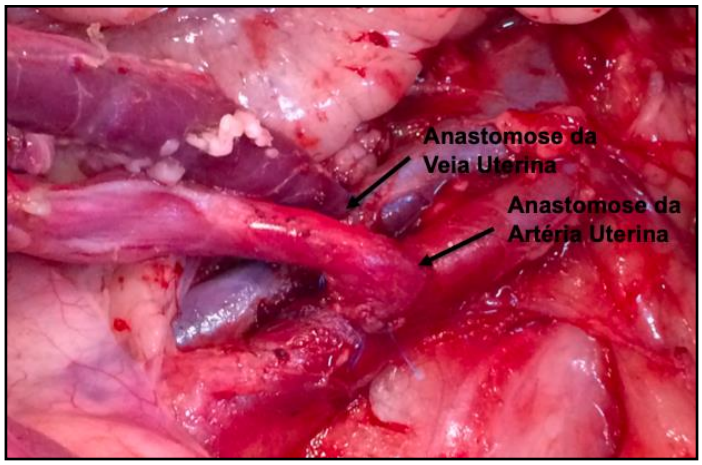
Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 13 - Preparação da artéria uterina para o implante, mostrando o segmento da artéria ilíaca interna seccionado na face contralateral à emergência da artéria uterina, aumentando assim a área para realização da anastomose no momento do implante.

Fonte: Produção do próprio autor.

O enxerto uterino foi então colocado na cavidade pélvica. Para o implante, inicialmente, um clamp vascular (clamp vascular de Satinsky) foi posicionado na veia ilíaca externa direita, feito uma incisão de cerca de 5-7mm neste vaso e confeccionada a anastomose termino-lateral com a veia uterina direita, utilizando-se fio de prolipropileno nº 7.0 em sutura contínua. Realizava-se então o clampeamento da artéria ilíaca externa direita, com dois clamps vasculares semi retos (clamp vascular de Cooley) posicionados proximal e distalmente ao local da realização da anastomose. Prosseguia-se então com uma incisão de cerca de 7-8mm na artéria ilíaca externa direita e foi confeccionada a anastomose término lateral da artéria uterina direita, utilizando-se fio de polipropileno nº 7.0 em sutura contínua (Figura 14). Após as anastomoses vasculares do lado direito, os clamps vasculares foram retirados, realizada a reperfusão do enxerto e posteriormente foram confeccionadas as anastomoses vasculares contralaterais seguindo os mesmos padrões das anastomoses vasculares descritas previamente (Figura 15).

Figura 14 - Anastomoses da artéria e veia uterina.



Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 15 - Enxerto sendo perfundido pela técnica de revascularização sequencial uterina.

Fonte: Produção do próprio autor.

O enxerto era então fixado ao peritônio e a vagina suturada com fio de PDS 3.0, com ponto contínuo.

4.2 Comparação entre os grupos (revascularização sequencial e revascularização simultânea do enxerto uterino)

A análise qualitativa incluiu 34 variáveis, de 11 parâmetros avaliados nos dois grupos experimentais. Na Tabela 3 está descrita a alocação dos animais nos grupos experimentais. Foram avaliados 10 animais, sendo 5 no grupo sequencial (SE) e 5 no grupo simultâneo (SI), parâmetro este definido pelo pesquisador.

Tabela 3 - Estatística descritiva da variável tipo de revascularização com o número de pacientes (N), porcentagem e intervalo de confiança (IC) de 95% por categoria.

Variável	Categorias	n	% (IC95%)
Tipo de Revascularização	Sequencial	5	50,00 (30,00-85,79)
	Simultânea	5	50,00 (30,00-85,79)

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

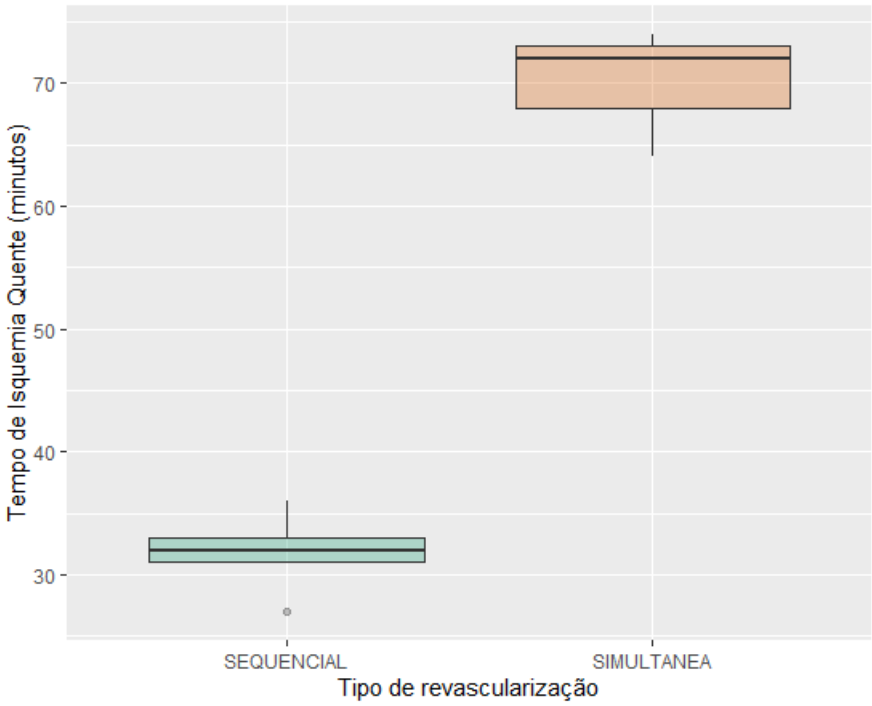
Na avaliação dos tempos do procedimento observamos que os tempos de cirurgia e isquemia total não mostraram diferença, mas o tempo de isquemia quente foi significativamente menor no grupo de revascularização sequencial (p=0,008). Na Tabela 4 observamos a estatística descritiva de tempo para cada grupo cirúrgico, e o tempo de isquemia quente para o grupo que utilizamos a técnica sequencial é menos que a metade do tempo quando comparado à técnica simultânea. Na Figura 16 observamos o *box-plot* em que não há sobreposição entre os tempos de isquemia quente dos grupos, corroborando o resultado observado na análise estatística.

Tabela 4 - Estatística descritiva dos tempos de cirurgia e isquemia de acordo com o tipo de revascularização.

		Tipo de Revascularização		p-valor Wilcoxon
		Sequencial	Simultânea	
Tempo de Cirurgia (minutos**)**	**Média (±DP)**	242 (±22,53)	242 (±18,28)	1
	Mediana (IIQ)	242 (220-263)	247 (234-248)	
	Min-Max	219-266	215-264	
Tempo de isquemia Quente (minutos**)**	**Média (±DP)**	32 (±3,27)	70 (±4,15)	0,008
	Mediana (IIQ)	32 (31-33)	72 (68-73)	
	Min-Max	27-36	64-74	
Tempo de isquemia Total (minutos**)**	**Média (±DP)**	76 (±16,69)	97 (±13,22)	0,151
	Mediana (IIQ)	68 (67-80)	100 (90-102)	
	Min-Max	61-103	78-113	

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Figura 16 - Tempo de isquemia quente (em minutos), por tipo de revascularização.



Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Em relação a avaliação hemodinâmica, a Tabela 5 apresenta os dados de PAM dos animais, em cada um dos tempos, separado por grupo. Aqui também não foi possível observar diferença significativa entre os grupos, e além disso, em ambos os grupos a PAM parece reduzir de forma semelhante entre os tempos.

Tabela 5 - Estatística descritiva da pressão arterial média em tempos T0, T1 e T2, de acordo com o tipo de revascularização.

		Tipo de Revascularização		p-valor Wilcoxon
		Sequencial	**Simultânea**	
Pressão Arterial Média T0	**Média (±DP)**	78,6 (±14,79)	79,8 (±14,64)	1
	Mediana (IIQ)	78 (70-92)	76 (70-84)	
	Min-Max	59-94	66-103	
Pressão Arterial Média T1	**Média (±DP)**	67 (±14,2)	68,8 (±9,36)	0,69
	Mediana (IIQ)	65 (56-80)	66 (62-71)	
	Min-Max	51-83	61-84	
Pressão Arterial Média T2	**Média (±DP)**	68,6 (±17,1)	62,8 (±8,32)	0,834
	Mediana (IIQ)	64 (63-76)	66 (60-66)	
	Min-Max	47-93	50-72	
Pressão Arterial Média T2-T0	**Média (±DP)**	-10 (±19,91)	-17 (±15,52)	0,69
	Mediana (IIQ)	-14 (-16--12)	-18 (-26--6)	
	Min-Max	-31-23	-37-2	

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Na Tabela 6 observamos a descritiva do DC separado por grupos, nos diferentes tempos. Não foi encontrada diferença significativa entre grupos.

Tabela 6 - Estatística descritiva da pressão arterial média em tempos 0, 1 e 2, de acordo com o tipo de revascularização.

		Tipo de Revascularização		p-valor Wilcoxon
		Sequencial	**Simultânea**	
Débito Cardíaco T0	**Média (±DP)**	4,12 (±1,35)	3,74 (±0,58)	1
	Mediana (IIQ)	4,19 (2,83-5,19)	4 (3,23-4,2)	
	Min-Max	2,7-5,7	3-4,26	
Débito Cardíaco T1	**Média (±DP)**	2,56 (±0,7)	3,44 (±1,07)	0,151
	Mediana (IIQ)	2,13 (2,08-3,12)	3,6 (2,6-4,4)	
	Min-Max	1,95-3,5	2,1-4,5	
Débito Cardíaco T2	**Média (±DP)**	3,43 (±1,66)	3,16 (±1,22)	0,917
	Mediana (IIQ)	3,8 (1,9-4,5)	3,5 (2,2-4)	
	Min-Max	1,55-5,4	1,6-4,5	
Débito Cardíaco T2-T0	**Média (±DP)**	-0,69 (±0,39)	-0,58 (±1,08)	0,69
	Mediana (IIQ)	-0,69 (-0,8--0,39)	-0,26 (-1,4-0,27)	
	Min-Max	-1,28--0,3	-2-0,5	

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Para avaliação dos dados de DC e PAM ao longo do tempo, foram realizados testes de ANOVA, com os resultados expressos na Tabela 7. Notamos que não foi encontrada diferença significativa entre grupos, tempo ou na interação grupo:tempo para a pressão arterial. Já para o DC, notamos que há uma influência do tempo no parâmetro, mas sem efeito do grupo ou grupo:tempo, o que significa que os dois grupos são semelhantes e que os dados variam no tempo de forma semelhante para os dois. O que influencia o débito cardíaco é o tempo decorrido.

Tabela 7 - Resultados da análise semelhante a ANOVA (ANOVA não paramétrica) das variáveis de interesse por tipo de revascularização.

PAM	**p-valor**	**Interpretação**
Grupo	0,984	Considerando-se a soma de todos os tempos, não foi encontrada diferença na pressão arterial média entre os tipos de revascularização.
Tempo	0,074	Considerando-se a soma dos tipos de revascularização, não foi encontrada diferença significativa na pressão arterial média entre os tempos.
Grupo:Tempo	0,788	Observamos que a pressão arterial média varia de forma semelhante nos tempos, entre os tipos de revascularização

Continua.

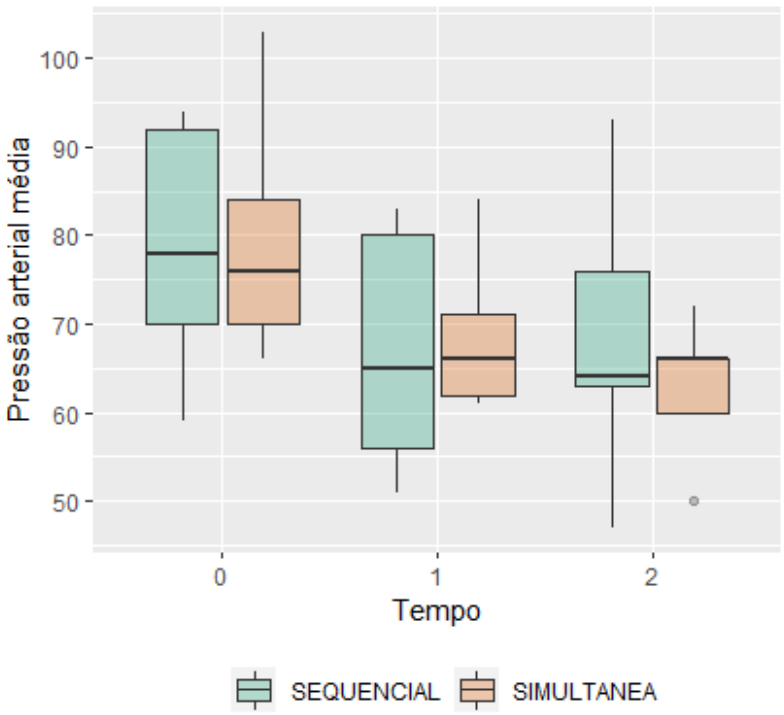
Conclusão.

DC	p-valor	Interpretação
Grupo	0,765	Considerando-se a soma de todos os tempos, não foi encontrada diferença no débito cardíaco entre os tipos de revascularização.
Tempo	0,024	Considerando-se a soma dos tipos de revascularização, há diferença significativa no débito cardíaco entre os tempos.
Grupo:Tempo	0,086	Observamos que o débito cardíaco varia de forma semelhante nos tempos, entre os tipos de revascularização

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

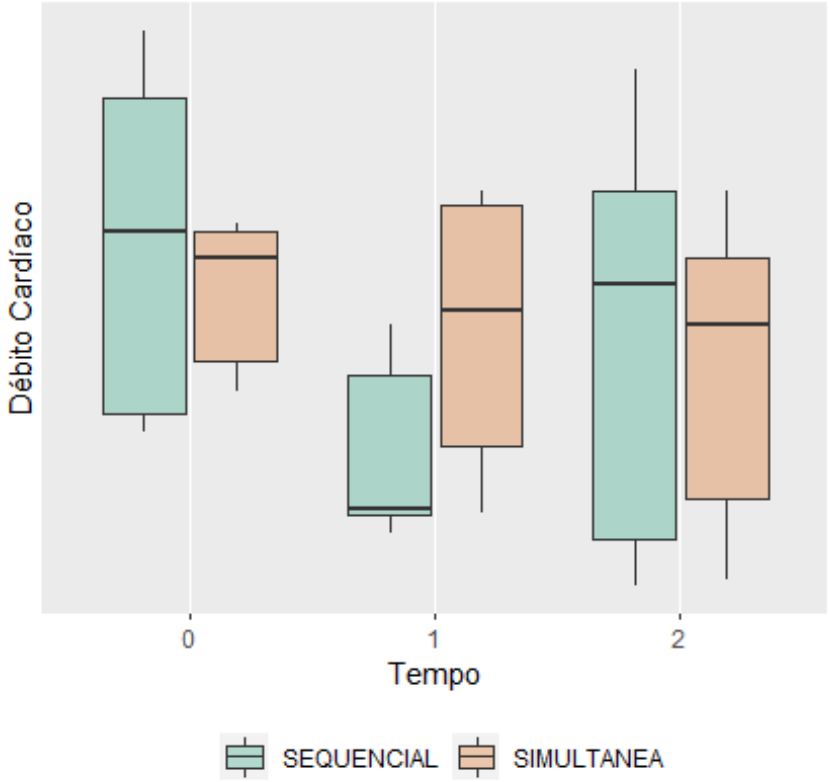
Na Figura 17 observamos que a PAM parece ter uma tendência de queda ao longo do tempo, mas sem significância estatística, enquanto na Figura 18 observamos que no DC essa tendência temporal é mais clara, mas sem diferença entre grupos.

Figura 17 - Box-plot da Pressão Arterial Média (PAM), comparando as medianas e intervalo interquartil entre os grupos experimentais, em cada um dos tempos avaliados.



Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Figura 18 - Box-plot do Débito Cardíaco (DC), comparando as medianas e intervalo interquartil entre os grupos experimentais, em cada um dos tempos avaliados.



Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Quanto à avaliação macroscópica do enxerto, segundo a impressão dos avaliadores (cirurgião principal, primeiro auxiliar e anestesista), em todos os 5 casos do grupo SI (Tabela 8), a revascularização uterina se deu de forma rápida e homogênea em ambos os lados do enxerto simultaneamente (Figura 19). No grupo SE (Tabela 9), após a revascularização pela artéria uterina direita, esta se deu, em todos os casos de forma rápida e homogênea no lado direito do enxerto. No lado esquerdo do enxerto em 4 casos a perfusão se deu de forma rápida e homogênea (Figura 20) e em apenas 1 caso (Animal 10) a perfusão ocorreu de forma lenta, estando totalmente perfundido 55 segundos após a reperfusão (Figura 21).

Tabela 8 - Avaliação macroscópica da revascularização do enxerto uterino na técnica de revascularização simultânea.

	Homogênea / Heterogênea	**Rápida(<30seg) / Lenta(>30seg) (Lado Direito)**	**Rápida(<30seg) / Lenta(>30seg) (Lado Esquerdo)**	**Bilateral / Unilateral**
Animal 1	Homogênea	Rápida(<30seg)	Rápida(<30seg)	Bilateral
Animal 3	Homogênea	Rápida(<30seg)	Rápida(<30seg)	Bilateral
Animal 5	Homogênea	Rápida(<30seg)	Rápida(<30seg)	Bilateral
Animal 7	Homogênea	Rápida(<30seg)	Rápida(<30seg)	Bilateral
Animal 9	Homogênea	Rápida(<30seg)	Rápida(<30seg)	Bilateral

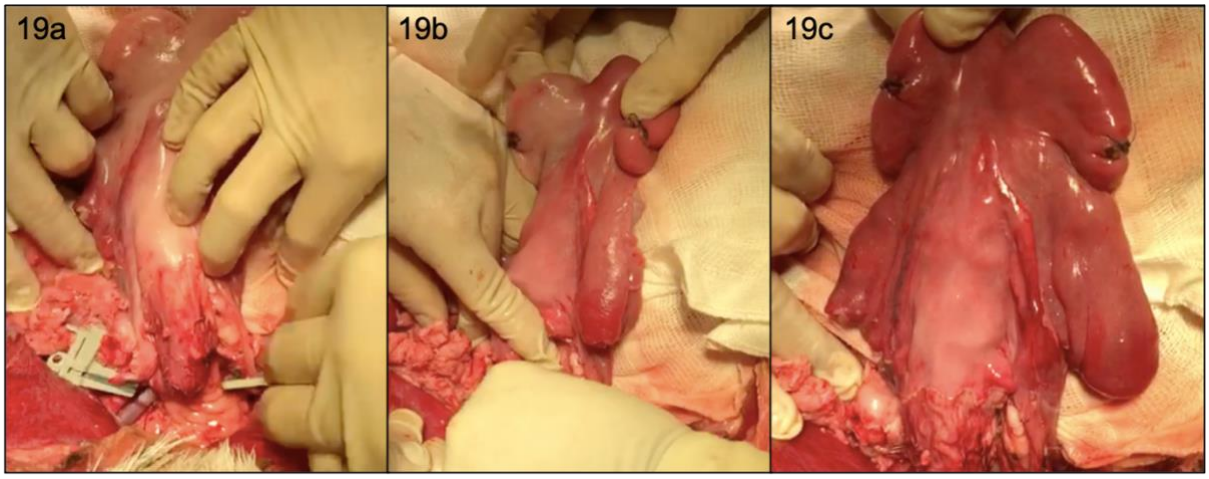
Fonte: Produção do próprio autor

Tabela 9 - Avaliação macroscópica da revascularização do enxerto uterino na técnica de revascularização sequencial.

	Homogênea / Heterogênea	**Rápida(<30seg) / Lenta(>30seg) (Lado Direito)**	**Rápida(<30seg) / Lenta(>30seg) (Lado Esquerdo)**	**Bilateral / Unilateral**
Animal 2	Homogênea	Rápida(<30seg)	Rápida(<30seg)	Bilateral
Animal 4	Homogênea	Rápida(<30seg)	Rápida(<30seg)	Bilateral
Animal 6	Homogênea	Rápida(<30seg)	Rápida(<30seg)	Bilateral
Animal 8	Homogênea	Rápida(<30seg)	Rápida(<30seg)	Bilateral
Animal 10	Homogênea	Rápida(<30seg)	Lenta(>30seg)	Bilateral

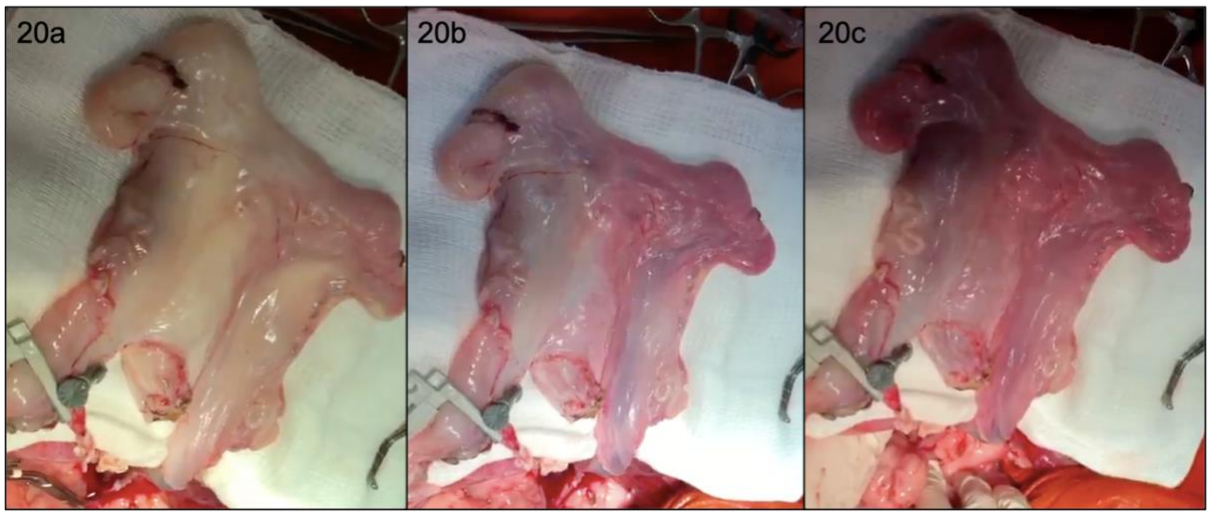
Fonte: Produção do próprio autor

Figura 19 - Exemplo do aspecto da perfusão do útero (animal 5) na revascularização simultânea nos momentos inicial (19a), 30 segundos (19b) e 60 segundos (19c) após perfusão. Demonstrando o útero completamente perfundido no momento 30 segundos pós perfusão.



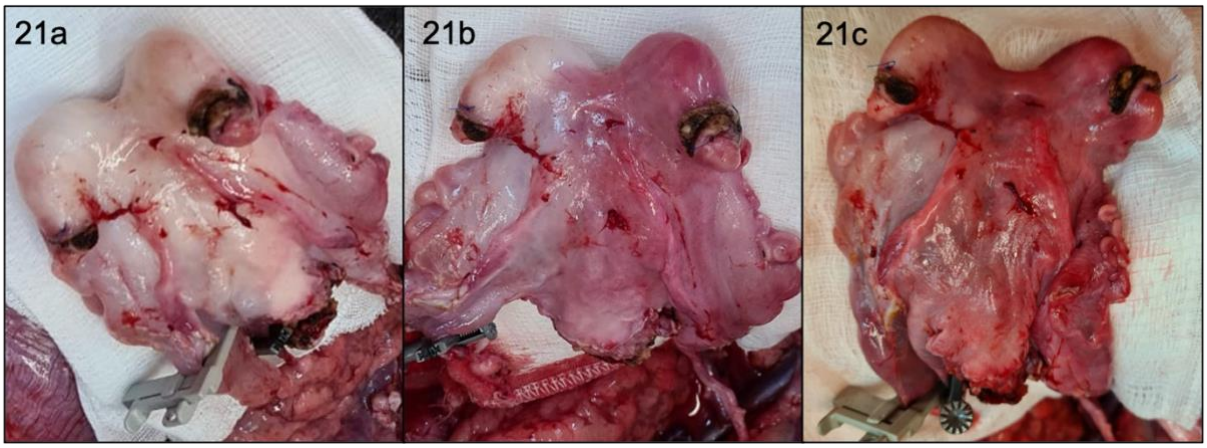
Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 20 - Exemplo do aspecto da perfusão do útero (animal 02) na revascularização sequencial nos momentos inicial (20a), 30 segundos (20b) e 60 segundos (20c) após perfusão. Demostrando o útero completamente perfundido no momento 30 segundos pós perfusão.



Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 21 - Aspecto da perfusão do útero (animal 10) na revascularização sequencial nos momentos inicial (21a), 30 segundos (21b) e 60 segundos (21c) após a reperfusão do enxerto. Mostrando o útero parcialmente perfundido 30 segundos após a perfusão, e totalmente perfundido 60 segundos após reperfusão.



Fonte: Produção do próprio autor.

Na Tabela 10 observamos os resultados da avaliação macroscópica. Cabe notar que nesta avaliação, não houve variação entre os animais para a homogeneidade, lateralidade ou velocidade de reperfusão no lado esquerdo e a velocidade de reperfusão do lado direito foi rápida em 90% dos animais.

Tabela 10 - Estatística descritiva das variáveis qualitativas da avaliação macroscópica com o número de pacientes (N), porcentagem e intervalo de confiança (IC) de 95% por categoria.

Avaliação Macroscópica	Categorias	n	% (IC95%)
Homogeneidade*	Homogênea	10	100,00 (100,00-100,00)
Velocidade de Reperfusão (Direito)	Lenta	1	10,00 (0,00-26,53)
	Rápida	9	90,00 (80,00-100,00)
Velocidade de Reperfusão (Esquerdo)*	Rápida	10	100,00 (100,00-100,00)
Lateralidade*	Bilateral	10	100,00 (100,00-100,00)

*** Variáveis excluídas da análise por serem constantes, sem variação de valores no diagnóstico.**

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Na Tabela 11 observamos que não foi encontrada associação entre o tipo de reperfusão e a avaliação macroscópica do lado direito do órgão. Houve apenas um caso de reperfusão lenta, observado no grupo sequencial. Apesar de este caso representar 20% das ocorrências deste grupo, o valor real de ocorrências de reperfusão lenta pode ficar com 95% de confiança, em valores entre 2 e 63%.

Tabela 11 - Frequência das variáveis de reperfusão sanguínea em análise macroscópica por tipo de revascularização, com teste estatístico de associação (qui-quadrado).

	Tipo de revascularização				p-valor Qui-quadrado
	Sequencial		Simultânea		
Avaliação Macroscópica (Direito)	**N**	**% (IC95%)**	**N**	**% (IC95%)**	
Lenta	1	20 (2,3-62,9)	0	0 (0-0)	1
Rápida	4	80 (37,1-97,7)	5	100 (100-100)	

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Na avaliação dos parâmetros laboratoriais é importante frisarmos que para todos os exames (AST, CPK, DHL e lactato), no momento T0, o valor é sempre o mesmo, visto que neste momento a coleta de sangue foi realizada no cateter venoso central, enquanto nos momentos T1 e T2 a coleta se deu nas veias uterinas direita e esquerda.

Para a enzima AST, não foi possível observar diferença significativa comparando as técnicas cirúrgicas entre os grupos. Na Tabela 12 observamos que há diferenças nos valores entre tempos e entre grupos, mas todas dentro da variação estatística. Já no tempo zero observamos que os parâmetros de AST tem grande diferença entre grupos, mas também grande variabilidade, o que impede a arguição de diferença estatística.

Tabela 12 - Estatística descritiva do parâmetro hematológico AST (lados direito e esquerdo em tempos 0, 1 e 2), de acordo com o tipo de revascularização.

		Tipo de Revascularização		p-valor Wilcoxon
		Sequencial	Simultânea	
AST T0	**Média (±DP)**	69,2 (±23,36)	104 (±36,12)	0,222
	Mediana (IIQ)	72 (53-86)	111 (69-128)	
	Min-Max	39-96	65-147	
AST VD T1	**Média (±DP)**	71,6 (±19,18)	90,6 (±29,68)	0,209
	Mediana (IIQ)	75 (62-75)	86 (83-110)	
	Min-Max	47-99	48-126	
AST VD T2	**Média (±DP)**	70 (±34,6)	101,4 (±29,58)	0,31
	Mediana (IIQ)	61 (60-98)	88 (85-108)	
	Min-Max	22-109	76-150	
AST VD T2-T0	**Média (±DP)**	0,8 (±27,22)	-2,6 (±35,02)	0,69
	Mediana (IIQ)	13 (-26-22)	3 (-35-16)	
	Min-Max	-31-26	-40-43	

Continua.

Conclusão.

		Tipo de Revascularização		p-valor Wilcoxon
		Sequencial	Simultânea	
AST VE T1	**Média (±DP)**	74,2 (±44,17)	69,2 (±31,32)	1
	Mediana (IIQ)	77 (49-95)	90 (36-90)	
	Min-Max	17-133	34-96	
AST VE T2	**Média (±DP)**	74,4 (±11,87)	78,6 (±46,83)	1
	Mediana (IIQ)	75 (71-77)	81 (47-83)	
	Min-Max	58-91	30-152	
AST VE T2-T0	**Média (±DP)**	5,2 (±29,84)	-25,4 (±32,92)	0,249
	Mediana (IIQ)	19 (-25-22)	-28 (-39--18)	
	Min-Max	-28-38	-66-24	

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Na Tabela 13 observamos os valores de CPK para cada grupo avaliado. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos, em cada tempo. Observamos que os valores parecem aumentar entre os tempos, mas a diferença entre T2 e T0 foi semelhante entre os grupos.

Tabela 13 - Estatística descritiva do parâmetro hematológico CPK (lados direito e esquerdo em tempos 0, 1 e 2), de acordo com o tipo de revascularização.

		Tipo de Revascularização		p-valor Wilcoxon
		Sequencial	Simultânea	
CPK T0	**Média (±DP)**	602,78 (±576,36)	436,86 (±289,7)	1
	Mediana (IIQ)	587,3 (151,1-629)	326,4 (308,5-336)	
	Min-Max	106,8-1539,7	260,9-952,5	
CPK VD T1	**Média (±DP)**	2008,62 (±2842,49)	2670,86 (±3763,82)	1
	Mediana (IIQ)	483,7 (454,8-2110,1)	454,1 (431-3302,7)	
	Min-Max	96-6898,5	166,2-9000,3	
CPK VD T2	**Média (±DP)**	3438,78 (±6696,64)	5648,96 (±10274,07)	0,548
	Mediana (IIQ)	523,7 (118,4-1121)	1027,7 (328,7-2767,4)	
	Min-Max	37,3-15393,5	185,2-23935,8	
CPK VD T2-T0	**Média (±DP)**	2836 (±6670,11)	5212,1 (±10308,04)	0,31
	Mediana (IIQ)	-63,6 (-69,5--32,7)	766,8 (20,2-1814,9)	
	Min-Max	-418,7-14764,5	-141,2-23599,8	
CPK VE T1	**Média (±DP)**	1810,42 (±2475,28)	2551,34 (±4734,69)	1
	Mediana (IIQ)	467,9 (308-2200,8)	350,7 (326,6-944,5)	
	Min-Max	98-5977,4	131,4-11003,5	
CPK VE T2	**Média (±DP)**	2612,1 (±4587,85)	2558,16 (±4434,54)	0,841
	Mediana (IIQ)	514,2 (482,7-1120,4)	424,9 (394-1134,9)	
	Min-Max	148,1-10795,1	366,9-10470,1	
CPK VE T2-T0	**Média (±DP)**	2009,32 (±4568,51)	2121,3 (±4479,66)	0,548
	Mediana (IIQ)	-3 (-73,1-375,9)	164 (85,5-182,4)	
	Min-Max	-419,3-10166,1	40,5-10134,1	

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

O parâmetro DHL (Tabela 14) também parece aumentar ao longo do tempo, mas os valores de IIQ que incluem zero nas variáveis de diferença T2-T0, demonstram que

os valores aumentam e diminuem de forma semelhante – em torno do zero. Apenas o VE no grupo simultâneo tem um IIQ totalmente negativo, mas ainda assim a amplitude dos dados inclui o zero.

Tabela 14 - Estatística descritiva do parâmetro hematológico DHL (lados direito e esquerdo em tempos 0, 1 e 2), de acordo com o tipo de revascularização.

		Tipo de Revascularização		p-valor Wilcoxon
		Sequencial	**Simultânea**	
DHL T0	**Média (±DP)**	785,86 (±348,06)	1174,12 (±751,79)	0,69
	Mediana (IIQ)	717,3 (698,6-774,2)	733,6 (687,3-1683,9)	
	Min-Max	391-1348,2	521,9-2243,9	
DHL VD T1	**Média (±DP)**	821,84 (±271,69)	839,88 (±337,44)	0,69
	Mediana (IIQ)	732,9 (667,3-885,7)	727,1 (545,8-1171,5)	
	Min-Max	562,9-1260,4	528,6-1226,4	
DHL VD T2	**Média (±DP)**	1154,68 (±1022,46)	1083,66 (±1006,94)	0,69
	Mediana (IIQ)	978,2 (744,6-1004,1)	768,9 (578,5-857,1)	
	Min-Max	165,3-2881,2	361,4-2852,4	
DHL VD T2-T0	**Média (±DP)**	368,82 (±999,85)	-90,46 (±538,83)	0,69
	Mediana (IIQ)	46 (-225,7-260,9)	56,6 (-372,2-81,6)	
	Min-Max	-344,1-2107	-826,8-608,5	
DHL VE T1	**Média (±DP)**	1143,8 (±813,39)	736,64 (±395,9)	0,548
	Mediana (IIQ)	1254,9 (698-1298,6)	670,7 (520-774,2)	
	Min-Max	139,4-2328,1	337,5-1380,8	
DHL VE T2	**Média (±DP)**	1064,9 (±688,24)	1032,28 (±977,24)	0,841
	Mediana (IIQ)	1004,7 (559,3-1384,8)	479,2 (402,5-1419,3)	
	Min-Max	321-2054,7	278,9-2581,5	
DHL VE T2-T0	**Média (±DP)**	279,04 (±704,42)	-141,84 (±300,68)	0,548
	Mediana (IIQ)	168,3 (-343,5-667,5)	-264,6 (-331,1--42,7)	
	Min-Max	-377,6-1280,5	-408,4-337,6	

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Na Tabela 15 estão descritos os parâmetros de lactato, por grupo, tempo e lateral, em que não foi possível encontrar diferença significativa entre grupos de tratamento. Os valores de Lactato são semelhantes entre grupos e apesar de variar no tempo, essa avaliação será feita posteriormente.

Tabela 15 - Estatística descritiva do parâmetro hematológico Lactato (lados direito e esquerdo em tempos 0, 1 e 2), de acordo com o tipo de revascularização.

		Tipo de Revascularização		p-valor Wilcoxon
		Sequencial	Simultânea	
Lactato T0	**Média (±DP)**	13,4 (±6,35)	16,6 (±7,47)	0,521
	Mediana (IIQ)	14 (7-18)	14 (14-22)	
	Min-Max	7-21	7-26	
Lactato VD T1	**Média (±DP)**	21 (±4,06)	24,4 (±5,98)	0,249
	Mediana (IIQ)	22 (19-24)	26 (23-27)	
	Min-Max	15-25	15-31	
Lactato VD T2	**Média (±DP)**	26 (±12,88)	25,6 (±6,47)	0,672
	Mediana (IIQ)	21 (20-21)	27 (21-31)	
	Min-Max	19-49	17-32	
Lactato VD T2-T0	**Média (±DP)**	12,6 (±11,8)	9 (±6,89)	0,917
	Mediana (IIQ)	13 (5-14)	10 (3-14)	
	Min-Max	0-31	1-17	
Lactato VE T1	**Média (±DP)**	21,4 (±4,77)	24,2 (±6,26)	0,6
	Mediana (IIQ)	21 (18-24)	26 (20-27)	
	Min-Max	16-28	16-32	
Lactato VE T2	**Média (±DP)**	26,2 (±12,42)	24,4 (±4,51)	0,674
	Mediana (IIQ)	22 (19-24)	25 (22-28)	
	Min-Max	18-48	18-29	
Lactato VE T2-T0	**Média (±DP)**	12,8 (±12,4)	7,8 (±6,76)	0,528
	Mediana (IIQ)	15 (4-17)	7 (4-14)	
	Min-Max	-2-30	-1-15	

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Para avaliação de todo o conjunto de dados de um mesmo parâmetro hematológico, usamos uma estatística semelhante a ANOVA (não paramétrica) que considera dois fatores: uma repetição do indivíduo (Lado), e outro fator de agregação de indivíduos (Grupo), em cada momento (Tempo) de avaliação. Observamos que em todas as avaliações que foram realizadas, o efeito do grupo nunca alcançou significância estatística de forma isolada ou quando avaliado em interação com outros fatores (Lado e/ou Tempo). Isso significa que não foi possível comprovar o efeito do grupo sobre as alterações dos parâmetros hematológicos (Tabela 16). Na avaliação de CPK e de Lactato, o tempo isoladamente apresentou variação estatisticamente significativa, com estes parâmetros aumentando ao longo das avaliações (Figura 23 e 25).

Na Figura 22 observamos que os valores de AST são semelhantes entre grupos (laranja e verde), com uma distribuição inicial de valores que tende a ser maior no grupo simultânea, mas com grande sobreposição entre as caixas (não significativo). O comportamento entre as laterais é homogêneo e com tendência temporal aparentemente estável.

Tabela 16 - Resultados da análise semelhante a ANOVA (ANOVA não paramétrica) das variáveis de interesse por tipo de revascularização e lado (esquerdo ou direito).

	p-valor	Interpretação
AST		
Grupo	0,195	Somando-se os Lados e os Tempos, não houve diferença na AST entre os Grupos
Lado	0,389	Somando-se os Grupos e os Tempos, não houve diferença na AST entre os Lados
Tempo	0,739	Somando-se os Lados e os Grupos, não houve diferença na AST entre os Tempos
Grupo:Lado	0,234	Somando-se os Tempos, não foi encontrada diferença no comportamento da AST dos Lados, entre Grupos.
Tempo:Lado	0,699	Somando-se os Grupos, não foi encontrada diferença no comportamento da AST dos Lados, ao longo do Tempo.
Grupo:Tempo	0,503	Somando-se os Lados, não foi encontrada diferença no comportamento da AST dos Grupos, ao longo do Tempo.
Grupo:Lado:Tempo	0,597	Não foi encontrado efeito do tratamento nos valores de AST, quando considerados os lados, ao longo do Tempo.
CPK		
Grupo	0,995	Somando-se os Lados e os Tempos, não houve diferença na CPK entre os Grupos
Lado	0,572	Somando-se os Grupos e os Tempos, não houve diferença na CPK entre os Lados
Tempo	0,028	Houve diferença significativa na CPK entre os Tempos, somando-se Lados e Grupos em cada Tempo.
Grupo:Lado	0,194	Somando-se os Tempos, não foi encontrada diferença no comportamento da CPK dos Lados, entre Grupos.
Tempo:Lado	0,366	Somando-se os Grupos, não foi encontrada diferença no comportamento da CPK dos Lados, ao longo do Tempo.
Grupo:Tempo	0,336	Somando-se os Lados, não foi encontrada diferença no comportamento da CPK dos Grupos, ao longo do Tempo.
Grupo:Lado:Tempo	0,632	Não foi encontrado efeito do tratamento nos valores de CPK, quando considerados os lados, ao longo do Tempo.
DHL		
Grupo	0,879	Somando-se os Lados e os Tempos, não houve diferença no DHL entre os Grupos
Lado	0,750	Somando-se os Grupos e os Tempos, não houve diferença no DHL entre os Lados
Tempo	0,714	Somando-se os Lados e os Grupos, não houve diferença no DHL entre os Tempos
Grupo:Lado	0,517	Somando-se os Tempos, não foi encontrada diferença no comportamento dos Lados entre Grupos.
Tempo:Lado	0,810	Somando-se os Grupos, não foi encontrada diferença no comportamento do DHL dos Lados, ao longo do Tempo.
Grupo:Tempo	0,121	Somando-se os Lados, não foi encontrada diferença no comportamento do DHL dos Grupos, ao longo do Tempo.
Grupo:Lado:Tempo	0,699	Não foi encontrado efeito do tratamento nos valores de DHL, quando considerados os lados, ao longo do Tempo.

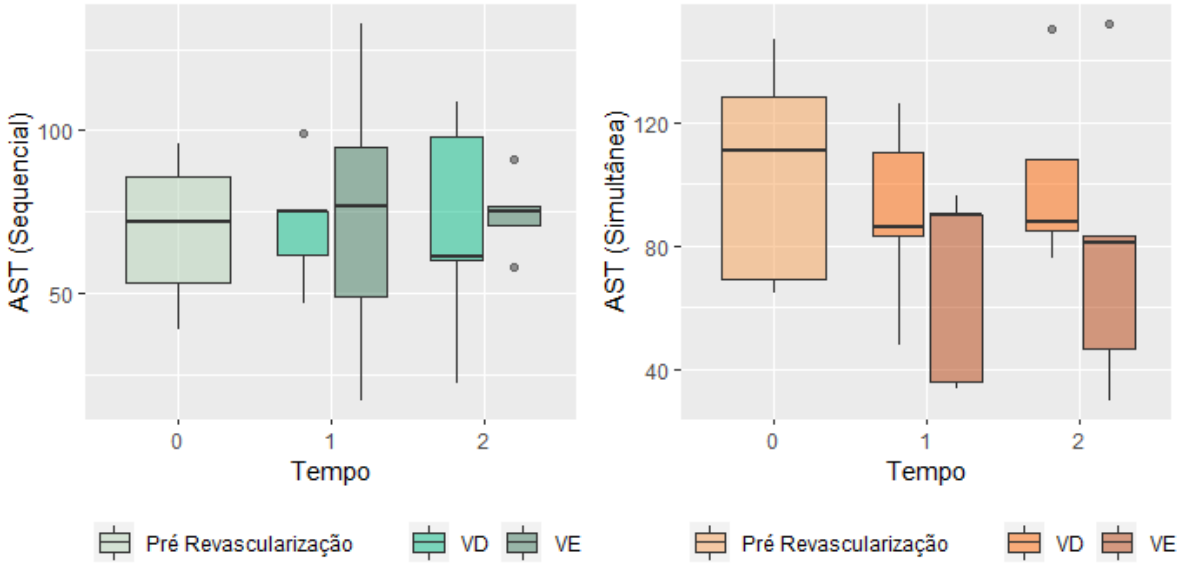
Continua.

Conclusão.

Lactato	p-valor	Interpretação
Grupo	0,304	Somando-se os Lados e os Tempos, não houve diferença no Lactato entre os Grupos
Lado	0,939	Somando-se os Grupos e os Tempos, não houve diferença no Lactato entre os Lados
Tempo	0,000	Houve diferença significativa no Lactato entre os Tempos, somando-se Lados e Grupos em cada Tempo.
Grupo:Lado	0,558	Somando-se os Tempos, não foi encontrada diferença no comportamento do Lactato dos Lados entre os Grupos.
Tempo:Lado	0,894	Somando-se os Grupos, não foi encontrada diferença no comportamento do Lactato dos Lados, ao longo do Tempo.
Grupo:Tempo	0,982	Somando-se os Lados, não foi encontrada diferença no comportamento do Lactato dos Grupos, ao longo do Tempo.
Grupo:Lado:Tempo	0,856	Não foi encontrado efeito do tratamento nos valores de Lactato, quando considerados os lados, ao longo do Tempo.

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

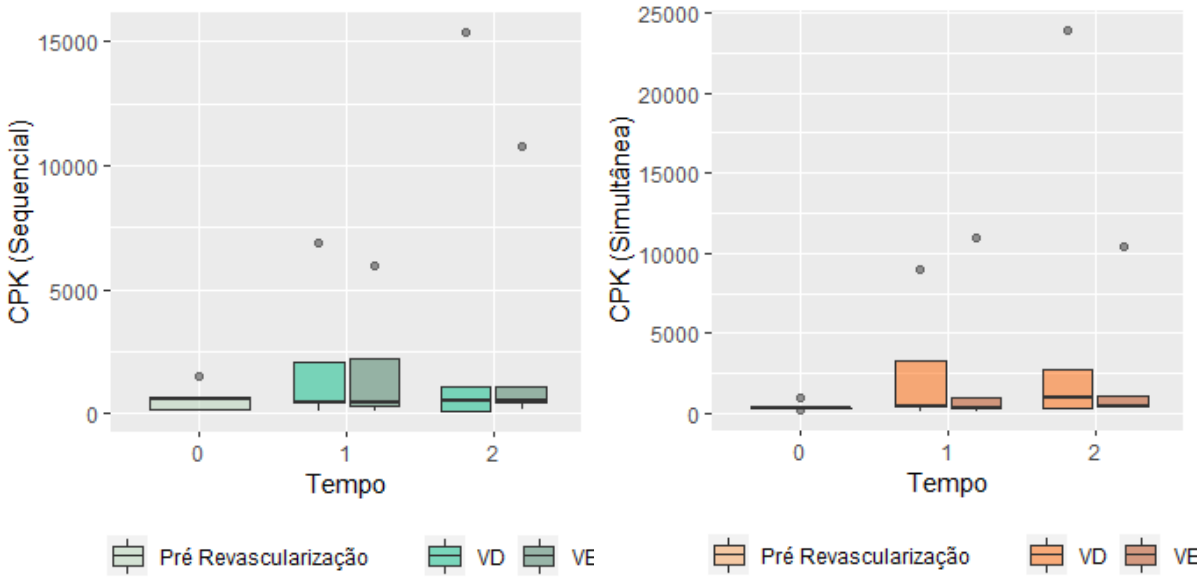
Figura 22 - Box plot dos valores medianos e intervalo interquartil de AST entre os lados, em cada um dos tempos medidos, agrupados pelo tipo de revascularização.



Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Na Figura 23 é relevante notar a existência de valores de *outliers* bastante extremos em todos os tempos e lados, em ambos os grupos, que chegam a dificultar a boa avaliação do gráfico.

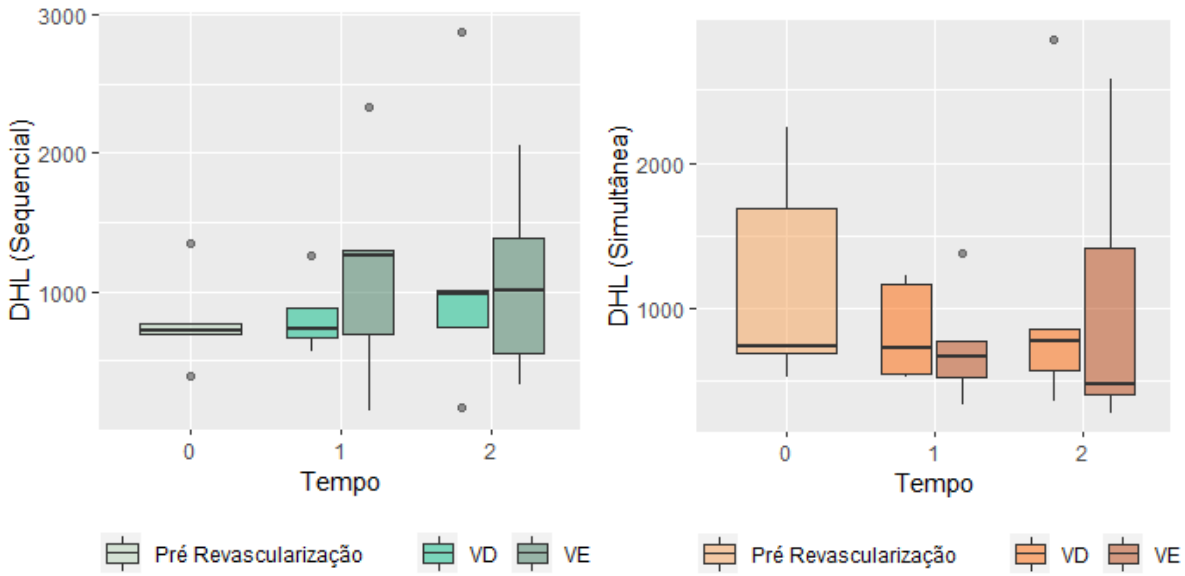
Figura 23 - Box plot dos valores medianos e intervalo interquartil de CPK entre os lados, em cada um dos tempos medidos, agrupados pelo tipo de revascularização.



Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Na Figura 24 observamos completa sobreposição dos parâmetros entre Grupos, Lado e Tempo, o que apoia a ideia de não diferença nos valores de DHL apontada na estatística.

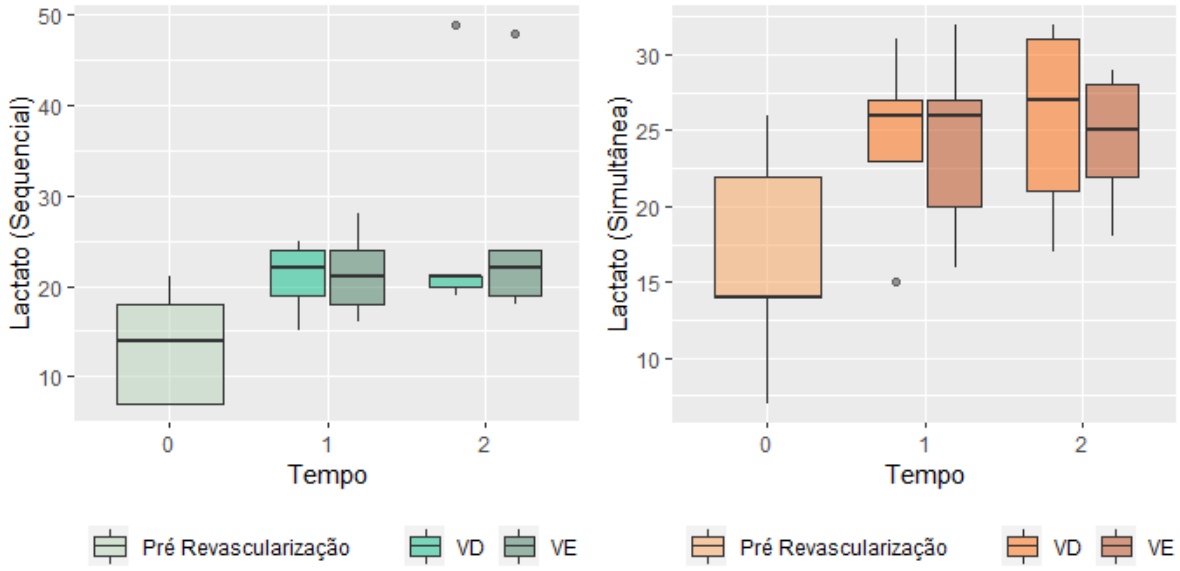
Figura 24 - Box plot dos valores medianos e intervalo interquartil de DHL entre os lados, em cada um dos tempos medidos, agrupados pelo tipo de revascularização.



Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

A Figura 25 ilustra de forma clara a tendência temporal de aumento nos valores de lactato. Essa tendência incide de forma semelhante sobre grupos e lados. Apesar de grande sobreposição e de inexistência de suporte estatístico, o grupo simultâneo parece apresentar valores levemente aumentados em relação ao outro grupo experimental, e isso poderia ser explicado em função do tempo de isquemia quente mais longo neste grupo.

Figura 25 - Box plot dos valores de Lactato entre os lados, em cada um dos tempos medidos, agrupados pelo tipo de revascularização.



Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Na Tabela 17 pode-se observar as variáveis de alterações histológicas, agrupadas em VD e VE, com os tempos nas linhas. Algumas avaliações não variaram (foram constantes) e por isso foram excluídas das análises posteriores, mas foram mantidas na tabela para informar o número de avaliações realizadas em cada tempo (Necrose e Apoptose em todos os tempos e Edema e Densidade de neutrófilos apenas no tempo 1, para ambos os lados – 16 variáveis excluídas). A densidade de neutrófilos foi avaliada como presente/ausente; seus dados, quando presentes, variaram de 6 a 30, mas devido ao N pequeno foram agrupados.

Tabela 17 - Estatística descritiva das variáveis qualitativas histológicas com o número de pacientes (N), porcentagem e intervalo de confiança (IC) de 95% por categoria.

		VD		VE	
Variável	**Categorias**	**n**	**% (IC95%)**	**n**	**% (IC95%)**
Edema T0*	Ausente	9	100,00 (100,00-100,00)	8	100,00 (100,00-100,00)
Edema T1	Ausente	5	55,56 (33,33-91,81)	3	33,33 (11,11-65,07)
	Presente	4	44,44 (22,22-80,70)	6	66,67 (44,44-98,40)
Edema T2	Ausente	3	33,33 (11,11-65,07)	3	30,00 (10,00-59,71)
	Presente	6	66,67 (44,44-98,40)	7	70,00 (50,00-99,71)
Estase T0	Ausente	1	11,11 (0,00-42,73)	2	25,00 (0,00-58,27)
	Focal	7	77,78 (66,67-100,00)	5	62,50 (37,50-95,77)
	Difusa	1	11,11 (0,00-42,73)	1	12,50 (0,00-45,77)
Estase T1	Ausente	1	11,11 (0,00-42,38)	1	11,11 (0,00-49,76)
	Focal	6	66,67 (44,44-97,94)	4	44,44 (22,22-83,09)
	Difusa	2	22,22 (0,00-53,49)	4	44,44 (22,22-83,09)
Estase T2	Ausente	2	22,22 (0,00-59,27)	1	10,00 (0,00-44,72)
	Focal	2	22,22 (0,00-59,27)	3	30,00 (10,00-64,72)
	Difusa	5	55,56 (33,33-92,61)	6	60,00 (40,00-94,72)
Necrose T0*	Ausente	9	100,00 (100,00-100,00)	8	100,00 (100,00-100,00)
Necrose T1*	Ausente	9	100,00 (100,00-100,00)	9	100,00 (100,00-100,00)
Necrose T2*	Ausente	9	100,00 (100,00-100,00)	10	100,00 (100,00-100,00)
Apoptose T0*	Ausente	9	100,00 (100,00-100,00)	8	100,00 (100,00-100,00)
Apoptose T1*	Ausente	9	100,00 (100,00-100,00)	9	100,00 (100,00-100,00)
Apoptose T2*	Ausente	9	100,00 (100,00-100,00)	10	100,00 (100,00-100,00)
Neutrófilos nos tecidos T0*	Ausente	9	100,00 (100,00-100,00)	8	100,00 (100,00-100,00)
Neutrófilos nos tecidos T1	Ausente	8	88,89 (77,78-100,00)	8	88,89 (77,78-100,00)
	Presente	1	11,11 (0,00-29,38)	1	11,11 (0,00-29,38)
Neutrófilos nos tecidos T2	Ausente	8	88,89 (77,78-100,00)	8	80,00 (70,00-100,00)
	Presente	1	11,11 (0,00-29,38)	2	20,00 (0,00-57,16)

*** Variáveis excluídas da análise por serem constantes, sem variação de valores no diagnóstico.**

Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

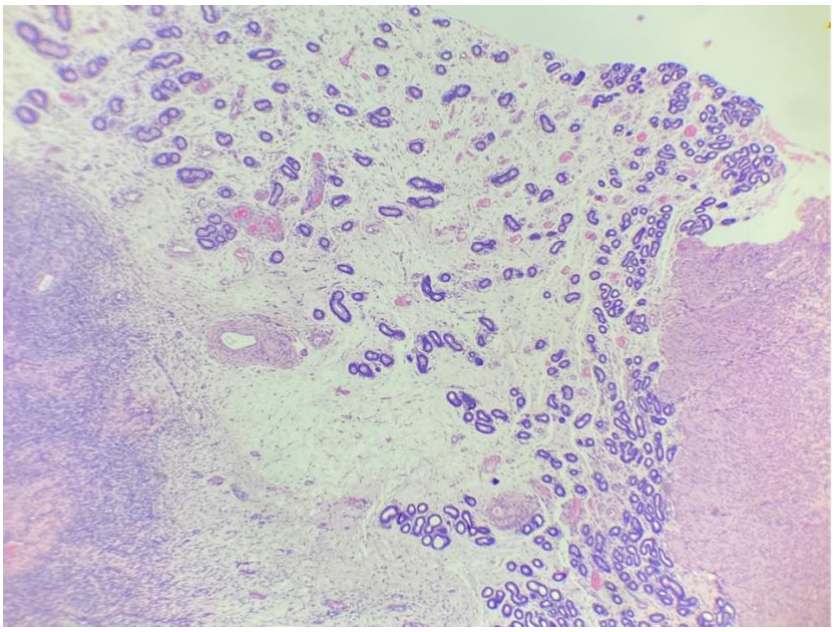
Os resultados das comparações histopatológicas dos grupos em cada tempo e lateral avaliada estão apresentadas na Tabela 18, onde nenhuma das variáveis histológicas em cada tempo encontrou associação significativa com os grupos de experimentação. Em T2, edema (Figura 26) esteve presente em 60% dos casos na VD e 60% na VE no grupo de revascularização sequencial e em 75% dos casos na VD e 80% na VE no grupo simultâneo. Estase (Figura 27 e 28) esteve presente em 100% dos casos na VD e 80% VE no grupo de revascularização sequencial e em 50% dos casos na VD e 80% na VE no grupo simultâneo. Já a presença de neutrófilos (Figura 28 e 29) foram identificados em 20% dos casos na VD e 20% na VE, no grupo de revascularização sequencial e em 20% na VE no grupo simultâneo.

Tabela 18 - Frequência das variáveis de análise histológica por tipo de revascularização, com teste estatístico de associação (qui-quadrado).

			Tipo de revascularização				p-valor Qui-quadrado
			Sequencial		Simultânea		
			N	% (IC95%)	N	% (IC95%)	
Edema							
VD	(T1)	Ausente	2	40 (9,44-79,06)	3	75 (28,38-97,15)	0,708
		Presente	3	60 (20,94-90,56)	1	25 (2,85-71,62)	
	(T2)	Ausente	2	40 (9,44-79,06)	1	25 (2,85-71,62)	1
		Presente	3	60 (20,94-90,56)	3	75 (28,38-97,15)	
VE	(T1)	Ausente	1	20 (2,25-62,86)	2	50 (12,28-87,72)	0,812
		Presente	4	80 (37,14-97,75)	2	50 (12,28-87,72)	
	(T2)	Ausente	2	40 (9,44-79,06)	1	20 (2,25-62,86)	1
		Presente	3	60 (20,94-90,56)	4	80 (37,14-97,75)	
Estase							
VD	(T0)	Ausente	1	20 (2,25-62,86)			0,357
		Difusa			1	25 (2,85-71,62)	
		Focal	4	80 (37,14-97,75)	3	75 (28,38-97,15)	
	(T1)	Ausente	1	20 (2,25-62,86)			0,165
		Difusa			2	50 (12,28-87,72)	
		Focal	4	80 (37,14-97,75)	2	50 (12,28-87,72)	
	(T2)	Ausente			2	50 (12,28-87,72)	0,154
		Difusa	4	80 (37,14-97,75)	1	25 (2,85-71,62)	
		Focal	1	20 (2,25-62,86)	1	25 (2,85-71,62)	
VE	(T0)	Ausente	1	25 (2,85-71,62)	1	25 (2,85-71,62)	0,549
		Difusa			1	25 (2,85-71,62)	
		Focal	3	75 (28,38-97,15)	2	50 (12,28-87,72)	
	(T1)	Ausente			1	25 (2,85-71,62)	0,384
		Difusa	3	60 (20,94-90,56)	1	25 (2,85-71,62)	
		Focal	2	40 (9,44-79,06)	2	50 (12,28-87,72)	
	(T2)	Ausente			1	20 (2,25-62,86)	0,368
		Difusa	4	80 (37,14-97,75)	2	40 (9,44-79,06)	
		Focal	1	20 (2,25-62,86)	2	40 (9,44-79,06)	
Neutrófilos nos tecidos							
VD	(T1)	Presente	1	20 (2,25-62,86)			1
		Ausente	4	80 (37,14-97,75)	4	100 (100-100)	
	(T2)	Presente	1	20 (2,25-62,86)			1
		Ausente	4	80 (37,14-97,75)	4	100 (100-100)	
VE	(T1)	Presente	1	20 (2,25-62,86)			1
		Ausente	4	80 (37,14-97,75)	4	100 (100-100)	
	(T2)	Presente	1	20 (2,25-62,86)	1	20 (2,25-62,86)	1
		Ausente	4	80 (37,14-97,75)	4	80 (37,14-97,75)	

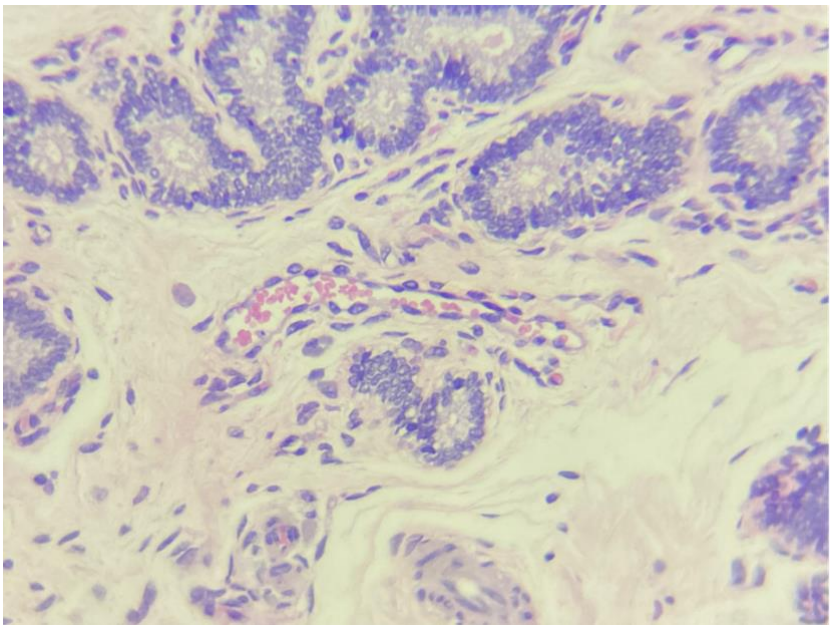
Fonte: Produção do Núcleo de Apoio em Epidemiologia e Estatística.

Figura 26 - Biópsia de tecido uterino corado em hematoxilina e eosina mostrando edema intersticial.



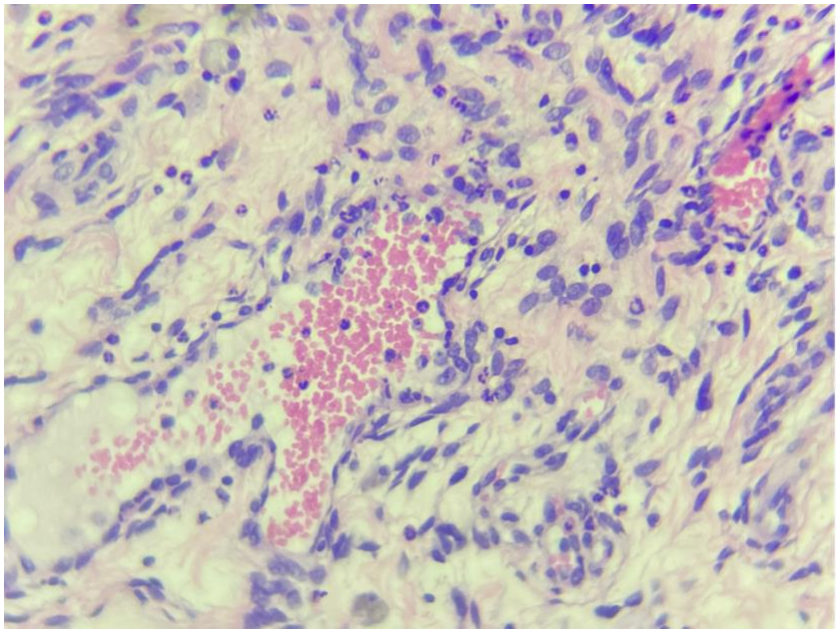
Fonte: Foto cedida pelo Dr. Ryan Yukimatsu Tanigawa (Patologista).

Figura 27 - Biópsia de tecido uterino corado em hematoxilina e eosina mostrando Estase em capilar e reatividade endotelial.



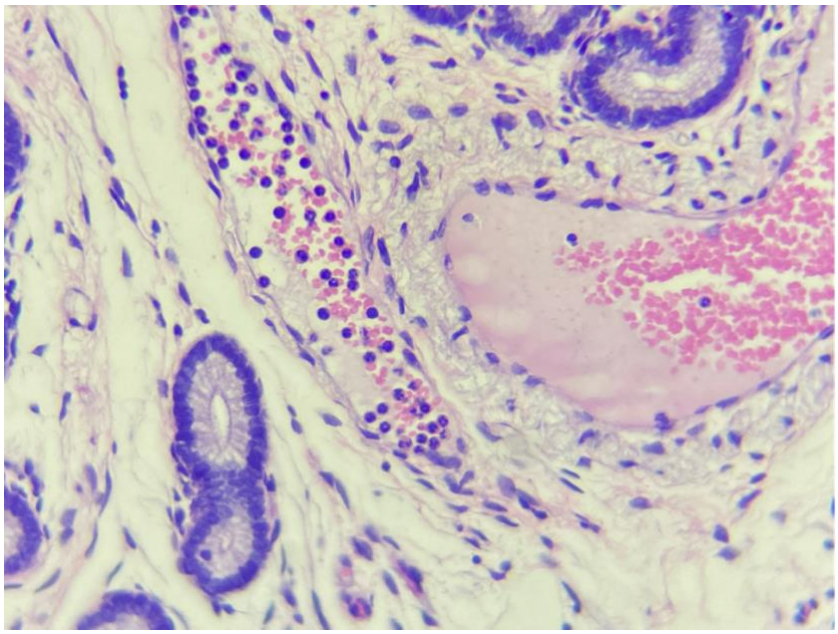
Fonte: Foto cedida pelo Dr. Ryan Yukimatsu Tanigawa (Patologista).

Figura 28 - Biópsia de tecido uterino corado em hematoxilina e eosina mostrando estase sanguínea com rolamento de neutrófilos e reatividade endotelial e infiltrado neutrofílico no estroma.



Fonte: Foto cedida pelo Dr. Ryan Yukimatsu Tanigawa (Patologista).

Figura 29 - Biópsia de tecido uterino mostrando rolamento de neutrófilos.



Fonte: Foto cedida pelo Dr. Ryan Yukimatsu Tanigawa (Patologista).

5 DISCUSSÃO

Esse é o primeiro trabalho na literatura que descreve a técnica de revascularização sequencial de transplante uterino em modelo experimental utilizando ovelhas.

Os primeiros estudos experimentais em transplante de órgãos do aparelho reprodutor feminino, foram realizados em meados dos anos 60.[20] Zhordania *et al*., em 1964, realizaram o autotransplante de útero e ovários, através da técnica de omentopexia para revascularização do enxerto, resultando em 20 gestações e 12 nascimentos. Pouco depois, Eraslan *et al.* realizaram o autotransplante de útero e ovários com revascularização do enxerto através de anastomoses vasculares. Sendo este o primeiro relato de reimplante útero-ovariano utilizando anastomoses vasculares, mostrando ser este um transplante tecnicamente possível.[22]

Alguns outros trabalhos científicos ainda foram publicados nesse período, porém, o interesse no desenvolvimento do transplante de útero declinou de forma significativa após a metade dos anos 70, provavelmente devido a problemas associados a imunossupressão disponível naquele momento e também ao desenvolvimento do procedimento de fertilização in vitro para o tratamento da infertilidade por fator tubário. Poucos trabalhos são encontrados na literatura durante as décadas de 80 e 90 sobre este assunto.[23]

Mais recentemente, o interesse no desenvolvimento do transplante de uterino ressurgiu e no ano de 2002, El-Akouri *et al.* desenvolveram um modelo animal em camundongos para estudar o processo de implante do enxerto e a gestação, bem como a imunologia do transplante do útero. Neste modelo eles realizaram o transplante heterotópico através de anastomoses vasculares, aonde apenas metade do útero era implantado e o útero nativo era mantido. A vantagem deste método seria ter o útero nativo para comparar os resultados no mesmo animal. Foram utilizados 42 camundongos consanguíneos. A taxa de sobrevida dos animais foi de aproximadamente 40% nos animais 1-21 aumentando para 71% nos animais 22-42. A proporção de enxertos viáveis, foi de 25% nos animais 1-21 e 87% nos animais 22-42. Sendo este o primeiro relato de transplante de útero com funcionalidade comprovada em camundongo.[24] Em 2003, utilizando esse mesmo modelo animal, eles avaliaram a taxa de gravidez e nascidos vivos após a transferência de blastocisto e demonstraram que as taxas de gravidez, a implantação de embrião, bem como o desenvolvimento pós-natal dos animais, foi semelhante entre os grupos estudados.[25]

E em 2010, Díaz-García *et al.* descreveram, em modelo animal utilizando ratos, gravidez após transplante alogênico de útero com a utilização de imunossupressão. Neste trabalho foram analisados 3 grupos. O primeiro grupo consistia em animais submetidos ao UTx e imunossuprimidos com tacrolimus (grupo UTx-Tac; n=8). Os outros grupos consistiam em animais sham-operados tratados com tacrolimus (grupo Sham-Tac; n = 5) e animais sham-operados sem tratamento com tacrolimus (grupo Sham-nãoTac; n = 6). A taxa de gravidez foi de 62,5% no grupo UTx-Tac, 60% no grupo Sham-Tac e 83% no grupo Sham-nãoTac.[45]

O modelo animal utilizando ovelhas foi também muito importante no desenvolvimento do transplante uterino e as vantagens da sua utilização estão relacionadas principalmente às semelhanças no tamanho e na anatomia vascular pélvica que apresentam em relação ao útero humano.[23] Nesse contexto, em 2010, Wranning *et al.* demonstraram a possibilidade de fertilidade e gravidez após o autotransplante do útero em um modelo animal de tamanho comparável ao humano.[26] E Ramirez *et al.*, em 2011, demonstraram pela primeira vez, em um modelo animal de transplante alogênico em ovelhas, que o útero transplantado poderia sustentar a gravidez, com a utilização de terapia de imunossupressão.[46]

O modelo experimental de UTx em ovelhas se mostrou uma ferramenta de treinamento bastante útil para a realização deste procedimento cirúrgico em humanos.[47,53]

Saso *et al.* descreveram uma técnica de autotransplante uterino em ovelhas, incluindo junto à artéria uterina, um pequeno segmento da artéria ilíaca interna. A utilização de um segmento da artéria ilíaca permitiu uma anastomose vascular mais confortável e segura e uma perfusão do enxerto mais adequada, tornando esta uma técnica cirúrgica viável para ser aplicada em um modelo humano.[49] E, na América Latina, Andraus *et al*. descreveram um modelo bastante semelhante de autotransplante de útero em ovelhas com anastomoses vasculares, também utilizando um segmento da artéria ilíaca interna para assim facilitar as anastomoses vasculares arteriais.[47] Modelo este que foi fundamental na preparação deste grupo, para a realização do primeiro UTx com doador cadáver, bem sucedido, no mundo.[32]

No presente trabalho foi descrita a técnica de revascularização sequencial do enxerto uterino. Nesta técnica, como o próprio nome sugere, a revascularização do enxerto foi feita de forma sequencial, isto é, foram realizadas as anastomoses arterial

e venosa de um lado do enxerto, o enxerto foi revascularizado e na sequência foram realizadas as anastomoses contralaterais, com o órgão já revascularizado.[44]

O objetivo de se descrever esta técnica foi reduzir TIQ associado ao procedimento. Pelo fato de serem necessárias a realização de pelo menos quatro anastomoses vasculares, serem estas anastomoses de pequeno calibre e delicadas, e o enxerto ser revascularizado apenas após a realização das anastomoses de ambos os lados do útero, o TIQ se torna consideravelmente longo. Brannstrom *et al.*, no primeiro *trial* clínico em transplante uterino realizado, relatam um TIQ médio de 1h e 23min (+/-9min) nos procedimentos realizados.[29]

A anatomia vascular uterina nos permitiu acreditar que a técnica sequencial de revascularização uterina seria tecnicamente viável. O útero é suprido principalmente com sangue proveniente das artérias uterinas. A artéria uterina origina-se bilateralmente da divisão anterior da artéria hipogástrica e segue medialmente no músculo elevador do ânus em direção ao colo do útero. Atravessa aproximadamente 2 cm do colo do útero acima da uretra, à qual fornece um pequeno ramo. Alcançando a lateral do útero, sobe tortuosamente até a junção da tuba uterina com o útero. Ramos da artéria uterina formam anastomoses com ramos da artéria ovariana, criando uma arcada arterial que corre na parte superior do ligamento largo. A artéria uterina também fornece ramos para o colo do útero e a vagina; estas últimas se conectam com ramos das artérias vaginais. As veias uterinas são paralelas às artérias, formando plexos que terminam na veia ilíaca interna; as veias uterinas se fundem com o plexo vaginal (plexo venoso útero-vaginal) para baixo e com as veias ovarianas para cima (plexo útero-ovariano), drenando na veia cava inferior à direita e na veia renal à esquerda.[50]

Esta vasta trama vascular uterina sugere ser possível uma adequada perfusão do enxerto mesmo com a revascularização inicial sendo realizada por apenas um lado do útero, como proposto por esta técnica.

O termo TIQ é utilizado para descrever a isquemia de células e tecidos sob condições normotérmicas. No cenário do transplante de órgãos este termo se refere a isquemia durante o implante, que acontece desde a remoção do órgão do gelo até a sua reperfusão.[51]

O impacto do TIQ no enxerto uterino foi estudado por Garcia *et al.* Eles avaliaram em um modelo animal utilizando ratos, a viabilidade do útero transplantado após exposição a um longo TIQ. Neste trabalho, foram analisados dois grupos, sendo

o primeiro submetido ao UTx padrão (controle; n = 10) e o segundo ao UTx modificado com um período estendido de quatro horas de isquemia quente (n = 10). Sinais evidentes de necrose foram observados em cinco dos 10 animais no grupo de isquemia quente estendida, em comparação com apenas um de 10 animais no grupo controle. Os enxertos uterinos do grupo de isquemia quente estendida, apresentaram alterações morfológicas muito mais intensas, demostrando que o tempo de isquemia quente estendido tem efeitos prejudiciais na sobrevida do útero após o transplante.[41]

Não existem estudos clínicos avaliando o TIQ no transplante uterino, porém, estudos clínicos realizados em outros órgãos transplantados demonstram claramente o seu impacto. Marasco *et al.*, em um estudo retrospectivo com 206 pacientes submetidos ao transplante cardíaco, demonstraram que um TIQ de 80 minutos foi associado a uma sobrevida significativamente reduzida do enxerto, quando comparado a um TIQ de 60 minutos.[38] Em um estudo realizado em 131.677 pacientes submetidos ao transplante renal, que avaliou a associação entre TIQ e mortalidade e disfunção de enxerto, observou-se que o grupo que foi submetido a um TIQ mais prolongado (>60 minutos) apresentou um aumento de 23% no risco relativo ajustado de morte ou disfunção do enxerto.[39] E um estudo realizado no transplante hepático que avaliou os fatores pré e perioperatórios associados a disfunção do enxerto, demonstrou que em uma incidência de disfunção primária do enxerto de 31,9% o TIQ prolongado (>45 minutos) foi o único fator de risco significativo entre outros parâmetros avaliados.[40]

A isquemia quente no transplante de órgãos é um dos fatores que influenciam diretamente no mecanismo da síndrome de isquemia e reperfusão (SIR), podendo levar a efeitos prejudiciais na sobrevida e na função do enxerto a longo prazo.[42]

A SIR no contexto do transplante é a privação do fluxo sanguíneo ao órgão, causando hipóxia e levando à disfunção da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. A diminuição da produção de trifosfato de adenosina (ATP) nas mitocôndrias induz ao metabolismo anaeróbico, disfunção das bombas de sódio-potássio e descolamento de ribossomos. O metabolismo anaeróbico reduz o nível de ATP e agentes antioxidantes nas células. Além disso, a retenção de ácido lático causa acidose metabólica, levando também a falha das bombas de sódio-potássio e bombas de cálcio na superfície da célula, causando retenção de sódio intracelular e potássio extracelular e diminuição da atividade das bombas trocadoras de sódio-hidrogênio. Nas células, o acúmulo de íons hidrogênio, sódio e cálcio causa hiperosmolaridade, o

que leva ao fluxo de água para o citoplasma e edema celular. A retenção de hidrogênio diminui o pH celular, levando a um comprometimento da atividade enzimática e aglomeração de cromatina nuclear. O desprendimento dos ribossomos diminui a síntese de proteínas. Após o estágio de reperfusão, a restauração do fluxo sanguíneo ao tecido isquêmico fornece oxigênio através dos glóbulos vermelhos. Paralelamente, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) aumenta devido à menor concentração de agentes antioxidantes nas células isquêmicas. ROS causam estresse oxidativo que promove disfunção endotelial, dano ao DNA e respostas inflamatórias locais. Cascatas inflamatórias e estresse oxidativo podem subsequentemente induzir uma tempestade de citocinas, resultando em morte celular causada por danos às estruturas celulares. A fase de reperfusão é dinâmica e pode persistir por vários dias.[51]

Não existem estudos clínicos que avaliem o impacto da SIR no transplante uterino, porém, se considerarmos o contexto de transplante hepático por exemplo, Ito *et al*. demonstraram que tempo de isquemia fria e quente prolongados, hipertensão do receptor/doador e doador do sexo masculino foram identificados como fatores de risco independentes associados a SIR moderada a grave e esta foi correlacionada com resultados inferiores do enxerto a curto prazo.[52]

Desta forma, baseado em estudos experimentais no transplante uterino e em estudos clínicos realizados em outros órgãos transplantados, parece bastante relevante buscar alternativas para reduzir o TIQ no contexto do transplante uterino.

No presente estudo, ambos os grupos tiveram um tempo de procedimento cirúrgico semelhantes, com uma mediana de 242min. (220-263min) no grupo SE versus 247min (234-248min) no grupo SI (p = 1,00), demonstrando que a técnica descrita não aumenta o tempo cirúrgico de procedimento. E ao mesmo tempo, indo ao encontro com o objetivo primário do trabalho, no grupo em que foi utilizada a técnica de revascularização sequencial do enxerto uterino, houve uma significativa redução na mediana do TIQ do procedimento de 72,00min no grupo SI para 32,00min no grupo SE (P valor = 0,008).

Também não foi observada diferença significativa nas alterações hemodinâmicas entre os grupos estudados, mesmo após a reperfusão do enxerto, momento em que a liberação de mediadores inflamatórios associados a SIR tende a levar a uma maior reação inflamatória sistêmica e instabilidade hemodinâmica. Apesar de se observar uma redução na PAM e no DC principalmente nos momentos T1 e T2,

essa redução não foi estatisticamente significativa e ocorreu de forma semelhante entre os grupos. Além disso, em nenhum dos procedimentos realizados houve a necessidade da utilização de droga vasoativa para estabilização hemodinâmica dos animais, sendo o controle hemodinâmico mantido apenas com uma reposição volêmica adequada.

Porém, além de mostrar que a técnica de revascularização sequencial do enxerto uterino possibilita uma significativa redução no TIQ, é importante demostrar também que não existe prejuízo ao órgão com a sua utilização. Como descrito anteriormente, na técnica sequencial a revascularização se dá, inicialmente, por apenas um lado do enxerto. O lado contralateral do útero é revascularizado apenas por vasos comunicantes sendo assim necessário avaliar se apesar de indireta, ela ocorre de maneira adequada.

Quando avaliado o aspecto macroscópico dos enxertos, foi observado que em todos os casos do grupo SI a revascularização se deu de forma rápida e homogênea em ambos os lados do enxerto, simultaneamente. No grupo SE, no lado esquerdo do enxerto, em apenas 1 (1/5) caso a perfusão ocorreu de forma lenta, porém, ao final de um período de 55 segundos, este enxerto apresentava-se completamente perfundido e homogêneo. Sendo assim, apesar de se ter observado em um dos casos, uma revascularização mais lenta em relação às demais, esse enxerto apresentou-se completamente perfundido mesmo antes da reperfusão contralateral. Demonstrando, em uma avaliação macroscópica, uma adequada perfusão do órgão em ambos os lados do enxerto, e em ambos os grupos analisados.

Para a comparação laboratorial das duas técnicas utilizadas, os marcadores analisados foram aspartato aminotransferase (AST), creatinofosfoquinase (CPK), desidrogenase Láctica (DHL) e lactato:

- Aspartato aminotransferase (AST), existe nos tecidos humanos como duas isoenzimas genética e imunologicamente distintas, uma localizada no citoplasma (c-AST) e outra na mitocôndria (m-AST). Músculo estriado, miocárdio e tecidos hepáticos são as suas principais fontes.[53]
- Creatinoquinase (CPK) catalisa a reação reversível da creatina e ATP formando fosfocreatina e ADP. A fosfocreatina pode ser vista como um reservatório de “fosfato de alta energia”, capaz de fornecer ATP. Clinicamente, a creatinoquinase é utilizada como um marcador de infarto agudo do miocárdio, rabdomiólise, distrofia muscular, entre outros.[54]

- Desidrogenase láctica (DHL) relaciona-se à suplementação da demanda energética em tecidos nos quais o suprimento aeróbico não se faz suficiente. A expressão de LDH é notada em quase todos os tecidos, fornecendo energia anaeróbica a tecidos que demandam maior aporte de energia, como nos diferentes tecidos musculares (músculo estriado esquelético, cardíaco e muscular liso) que apresentam maior expressão desta enzima. Assim, a aplicação mais importante da LDH no contexto clínico é observada dado o seu papel de marcador de lesão celular.[55]
- Lactato é formado a partir de piruvato como produto da glicólise anaeróbica, e é produzido principalmente em tecidos com alta taxa de glicose, como músculo esquelético, intestino, cérebro, pele e glóbulos vermelhos. O lactato é um importante marcador de choque circulatório e hipoperfusão tecidual.[56]

Diferente do que acontece por exemplo no transplante hepático onde um exame laboratorial como a alanino aminotrasferase (ALT) pode ser utilizado como marcador de lesão hepática, não existem ainda marcadores específicos para avaliação do enxerto no contexto do transplante uterino.[57,54] Como a camada muscular (miométrio) forma a quase totalidade da espessura do útero, a escolha dos marcadores AST, CK, DHL e lactato se deu por serem estes, apesar de não específicos, associados à lesão do tecido muscular e à hipoperfusão tecidual.

Ao se analisar o padrão do marcador CPK, que é um marcador relacionado principalmente à lesão no tecido muscular, observa-se que os valores parecem aumentar entre os tempos, principalmente quando avaliamos os momentos T1 e T2, porém a diferença entre T2 e T0 foi semelhante entre os grupos. Esse padrão de evolução do CPK demostra que apesar do lado esquerdo do enxerto no grupo sequencial ter sido revascularizado por vasos comunicantes, não foi observado um maior comprometimento do tecido muscular do útero neste lado, corroborando com o que foi encontrado também na avaliação macroscópica do enxerto uterino.

Quanto à variação do lactato, um marcador importante associado a hipoperfusão tecidual, se observa de forma clara a tendência temporal de aumento nos seus valores. Essa tendência incide de forma semelhante sobre grupos e lados, e apesar de grande sobreposição e da inexistência de suporte estatístico, o grupo de revascularização simultânea parece apresentar valores levemente aumentados em relação ao outro grupo, e isso poderia ser explicado em função do maior tempo de isquemia quente observado neste grupo.

Foram avaliadas também as alterações histológicas associadas a SIR no transplante uterino. Nesse contexto, Adachi *et al.* avaliaram o TIQ e as alterações histopatológicas relacionadas à lesão de isquemia e reperfusão no útero. Neste trabalho foram utilizados seis macacos cynomolgus fêmeas, sendo um controle e nos outros cinco animais os vasos uterinos e ovarianos foram clampeados bilateralemente por 0,5, 1, 2, 4 e 8 h, respectivamente. Após 4h de isquemia, apenas alterações discretas foram observadas, com dilatação dos poros nucleares e edema do retículo endoplasmático rugoso. Já após 8h de isquemia, foram identificados edema mitocondrial, perda de membrana plasmática, fragmentação nuclear e condensação de cromatina.[58]

Apesar deste trabalho sugerir que o útero toleraria um tempo de isquemia quente bastante longo de até 4h, não podemos transferir esse dado diretamente para o cenário do transplante uterino, visto que a metodologia utilizada exclui todo o contexto do transplante, como por exemplo o próprio procedimento cirúrgico. Além disso, apenas um animal foi analisado em cada momento do clampeamento, o que limita muito a análise dos resultados.

No presente trabalho, nenhuma das variáveis histológicas em cada tempo encontrou associação significativa entre os grupos estudados. Analisando o momento T2, observamos que edema e estase foram alterações bastante prevalentes. No grupo de revascularização sequencial, edema esteve presente em 60% dos casos na VD e 60% dos casos na VE, enquanto no grupo de revascularização simultânea em 75% dos casos na VD e 80% dos casos na VE. Quanto a estase, no grupo de revascularização sequencial, esteve presente em 100% dos casos na VD e 80% dos casos na VE e no grupo de revascularização simultânea em 50% dos casos na VD e 80% dos casos na VE. Por outro lado, necrose e apoptose não foram encontrados em nenhuma das amostras analisadas.

Corroborando com estes achados, Dahm-Kähler *et al.*, ao desenvolverem um modelo de autotransplante do útero em ovelhas, após os enxertos serem submetidos a uma isquemia fria de aproximadamente 1h seguida de isquemia quente de aproximadamente 1,5h, não observou a presença de necrose, edema ou fragmentos de células apoptóticas em nenhuma das amostras estudadas. Apenas uma estase leve dos vasos sanguíneos foi observada em um dos transplantes, demonstrando uma reação inflamatória muito sutil.[43]

Por outro lado, Garcia *et al.* ao avaliarem o impacto do TIQ prolongado no enxerto uterino de ratos, identificaram alterações histológicas bastante exuberantes nos enxertos submetidos a 4 horas de isquemia quente. No terceiro dia pós procedimento, três em 10 úteros apresentavam hemorragia estromal severa, trombose, edema, perda de células endometriais, infiltração leucocitária e necrose; quatro em 10 úteros apresentavam infiltração leucocitária e edema; dois em 10 úteros apresentavam edema importante; sendo que ausência total de lesões foi evidente em apenas um útero. Demonstrando que um TIQ prolongado está associado a alterações histológicas significativas no enxerto uterino.[59]

Dessa forma, no grupo submetido a revascularização sequencial do enxerto uterino não foram observadas alterações histológicas mais intensas quando comparado ao grupo controle e mesmo quando analisado o lado do enxerto que é inicialmente revascularizado apenas por vasos comunicantes, não foram identificadas alterações histológicas significativas, que sugerissem um maior grau de lesão tecidual associado a esta técnica.

Dentre as principais limitações deste estudo podemos citar o pequeno número de animais estudados em cada grupo, que está associado ao fato de optarmos pela utilização do menor número possível de animais para a realização de experimentos laboratoriais e também ao alto custo desses animais. Além disso, a avaliação final do enxerto foi realizada em um curto período de tempo (de apenas uma hora após a reperfusão) e isso se deu principalmente pela impossibilidade de se manter o animal vivo na estrutura disponível do laboratório utilizado. Por fim, uma outra limitação foi o fato dos animais não terem sido mantidos vivos por um período mais longo após o procedimento, e desta forma estarmos impossibilitados de comparar a viabilidade uterina a longo prazo e também a capacidade de gestação do útero transplantado nos grupos analisados.

O presente trabalho foi o primeiro a descrever a técnica de revascularização sequencial do enxerto uterino e demonstrou que no grupo submetido a revascularização sequencial houve uma redução significativa do TIQ e não foram identificados nas avaliações macroscópica, laboratorial e histológica alterações importantes, que sugerissem um maior grau de lesão tecidual associado a esta técnica. Uma preocupação com a utilização desta técnica era a possibilidade do lado do enxerto que inicialmente não recebe sangue diretamente pelos vasos uterinos

permanecer por um longo período inadequadamente perfundido, fato este que não se confirmou nas análises realizadas.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, foram descritos os passos da técnica de revascularização sequencial do enxerto uterino. Esta técnica reduziu de forma significativa o tempo de isquemia quente associado ao transplante de útero, quando comparada a técnica de revascularização simultânea do enxerto, no modelo de autotransplante em ovelhas.

Na comparação entre os grupos analisados, segundo os parâmetros estabelecidos de avaliação macroscópica, laboratorial e histológica, a técnica de revascularização sequencial não foi associada à maior lesão tecidual, instabilidade hemodinâmica ou aumento do tempo cirúrgico quando comparada à técnica de revascularização simultânea do enxerto uterino.

7 ANEXOS

Anexo A - Aprovação do CEUA.

MEDICINA USP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado **"Projeto experimental de transplante uterino em ovelhas"**, protocolo nº **063/16** sob a responsabilidade de Wellington Andraus, apresentado pelo Departamento de Gastroenterologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 22.06.16.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Dezembro/2016
Espécie/linhagem/raça	Ovino
Nº de animais	10
Peso/Idade	45-60 kg
Sexo	fêmea
Origem	Granja RG

CEUA-FMUSP, 22 de Junho de 2016

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

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

Anexo B - Termo de Outorga e Aceitação de Auxílios.

FAPESP

Para uso exclusivo da FAPESP
Processo: 2017/05389-4
Data Impressão: 10/08/2018 07:02:21
Folha: _____
Volume: _____
Rubrica: _____

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIOS

PROCESSO 2017/05389-4

Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, n° 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, concede ao OUTORGADO, a seguir qualificado, Auxílio para a realização do Projeto de Pesquisa a seguir especificado, nas instalações e com o apoio da INSTITUIÇÃO SEDE, de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que passam a ser parte integrante deste Termo.

1.OUTORGADO:	Flávio Henrique Ferreira Galvão CPF: 187.494.962-04 RG: 273322229-IIRGD/SP
2.Correspondência:	Rua Artur Prado 538 - Apt. 22, Bela Vista, São Paulo/SP, CEP 01322-000 fgalvao@usp.br
3.Instituição Sede:	Faculdade de Medicina/FM Universidade de São Paulo/USP
4.Projeto de Pesquisa:	Projeto experimental de transplante uterino em ovelhas.
5.Linha de Fomento:	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular
6.Área/Subárea:	Medicina Cirurgia
7.Coordenação:	Saúde I
8.Período da Vigência:	01/08/2018 a 31/07/2019
9.Relatórios Científicos:	30/08/2019
10.Prestações de Contas:	30/08/2019

Anexo C - Variáveis encaminhadas no banco de dados para análise, unidades de medida e tipo da variável.

	Rótulo	Categorias	Tipo
1	ANIMAL	identificador	qualitativa
2	Tipo de Revascularização	Sequencial; Simultânea	qualitativa
3	Tempo de Cirurgia	hh:mm	quantitativa
4	Tempo de Isquemia Total	hh:mm	quantitativa
5	Tempo de Isquemia Quente	hh:mm	quantitativa
6	AST (T0)	contínua	quantitativa
7	AST VD (T1)	contínua	quantitativa
8	AST VD (T2)	contínua	quantitativa
9	AST (T0)	contínua	quantitativa
10	AST VE (T1)	contínua	quantitativa
11	AST VE (T2)	contínua	quantitativa
12	CPK (T0)	contínua	quantitativa
13	CPK VD (T1)	contínua	quantitativa
14	CPK VD (T2)	contínua	quantitativa
15	CPK (T0)	contínua	quantitativa
16	CPK VE (T1)	contínua	quantitativa
17	CPK VE (T2)	contínua	quantitativa
18	DHL (T0)	contínua	quantitativa
19	DHL VD (T1)	contínua	quantitativa
20	DHL VD (T2)	contínua	quantitativa
21	DHL (T0)	contínua	quantitativa
22	DHL VE (T1)	contínua	quantitativa
23	DHL VE (T2)	contínua	quantitativa
24	Lactato (T0)	contínua	quantitativa
25	Lactato VD (T1)	contínua	quantitativa
26	Lactato VD (T2)	contínua	quantitativa
27	Lactato (T0)	contínua	quantitativa
28	Lactato VE (T1)	contínua	quantitativa
29	Lactato VE (T2)	contínua	quantitativa
30	Pressão Arterial Média T0	contínua	quantitativa
31	Pressão Arterial Média T1	contínua	quantitativa
32	Pressão Arterial Média T2	contínua	quantitativa
33	Débito Cardíaco T0	contínua	quantitativa
34	Débito Cardíaco T1	contínua	quantitativa
35	Débito Cardíaco T2	contínua	quantitativa
36	Macro: Homogeneidade	Homogêneo; Heterogêneo	qualitativa
37	Macro: velocidade de reperfusão (Direito)	Rápido (<30seg); Lento (>30seg)	qualitativa
38	Macro: velocidade de reperfusão (Esquerdo)	Rápido (<30seg); Lento (>30seg)	qualitativa
39	Macro: Lateralidade	Bilateral; Unilateral	qualitativa
40	Edema VD T0	Presente; Ausente	qualitativa
41	Edema VD T1	Presente; Ausente	qualitativa
42	Edema VD T2	Presente; Ausente	qualitativa
43	Edema VE T0	Presente; Ausente	qualitativa
44	Edema VE T1	Presente; Ausente	qualitativa
45	Edema VE T2	Presente; Ausente	qualitativa
46	Estase VD T0	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
47	Estase VD T1	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
48	Estase VD T2	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa

	Rótulo	Categorias	Tipo
49	Estase VE T0	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
50	Estase VE T1	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
51	Estase VE T2	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
52	Necrose VD T0	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
53	Necrose VD T1	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
54	Necrose VD T2	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
55	Necrose VE T0	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
56	Necrose VE T1	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
57	Necrose VE T2	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
58	Apoptose VD T0	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
59	Apoptose VD T1	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
60	Apoptose VD T2	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
61	Apoptose VE T0	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
62	Apoptose VE T1	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
63	Apoptose VE T2	Presente; Focal; Difusamente; Ausente	qualitativa
64	Neutrófilos nos tecidos VD T0	Ausente; Presente	qualitativa
65	Neutrófilos nos tecidos VD T1	Ausente; Presente	qualitativa
66	Neutrófilos nos tecidos VD T2	Ausente; Presente	qualitativa
67	Neutrófilos nos tecidos VE T0	Ausente; Presente	qualitativa
68	Neutrófilos nos tecidos VE T1	Ausente; Presente	qualitativa
69	Neutrófilos nos tecidos VE T2	Ausente; Presente	qualitativa

Anexo D - Variáveis criadas para a análise estatística.

Rótulo	Categorias	Tipo
Tempo de Cirurgia (min.)	T Cirurgia = HORA*60 + MINUTO	quantitativa
Tempo de isquemia Total (min.)	Tempo de isquemia Total = HORA*60 + MINUTO	quantitativa
Tempo de isquemia Quente (min.)	Tempo de isquemia Quente = HORA*60 + MINUTO	quantitativa
AST VD (T2-T0)	AST VD (T2) - AST (T0)	quantitativa
AST VE (T2-T0)	AST VE (T2) - AST (T0)	quantitativa
CPK VD (T2-T0)	CPK VD (T2) - CPK (T0)	quantitativa
CPK VE (T2-T0)	CPK VE (T2) - CPK (T0)	quantitativa
DHL VD (T2-T0)	DHL VD (T2) - DHL (T0)	quantitativa
DHL VE (T2-T0)	DHL VE (T2) - DHL (T0)	quantitativa
Lactato VD (T2-T0)	Lactato VD (T2) - Lactato (T0)	quantitativa
Lactato VE (T2-T0)	Lactato VE (T2) - Lactato (T0)	quantitativa
Pressão Arterial Média T2-T0	Pressão Arterial Média T2 - Pressão Arterial Média T0	quantitativa
Débito Cardíaco T2-T0	Débito Cardíaco T2 - Débito Cardíaco T0	quantitativa

Anexo E - Artigo publicado em revista indexada ao Pubmed.

Novel Technique in a Sheep Model of Uterine Transplantation

Rubens Macedo Arantes*, Lucas Souto Nacif, Rafael Soares Pinheiro, Vinicius Rocha-Santos, Rodrigo Bronze de Martino, Daniel Reis Waisberg, Carlos Andres Rodriguez Pantanali, Allana Fortunato, Marisa Rafaela Lima, Liliana Ducatti, Luciana Bertocco de Paiva Haddad, Dani Ejzenberg, Flávio Henrique Galvão, Wellington Andraus, and Luiz Carneiro-D'Albuquerque

Liver and Gastrointestinal Transplant Division, Department of Gastroenterology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Introduction. Uterine transplantation (UTx) is a surgical therapeutic modality designed for the treatment of patients with exclusive uterine factor infertility. Experimental models are paramount to study this transplant modality, and as the ewes' uteri are very similar to that of humans, they are frequently used with this purpose. The aim of this study is to describe a novel technical variation for UTx in sheep.

Methods. This study was conducted at Laboratory of Medical Investigation 37 of the University of São Paulo School of Medicine in São Paulo, Brazil, and was approved by the Ethics Committee of Animal Use of the university. We used 3 adult female sheep that weighed approximately 45 kg and were not pregnant. We performed the technique of uterine autotransplantation with a novel technical variation that we called sequential vascularization: first, we performed the right uterine artery and vein anastomoses, after which the uterine graft was vascularized, and then the contralateral vascular anastomoses were performed.

Conclusion. We described 3 successful uterine autotransplants in sheep models with sequential vascularization. This variation technique will probably allow warm ischemia time in UTx to significantly decrease.

UTERINE transplantation (UTx) is a surgical therapeutic modality designed for the treatment of patients with exclusive uterine factor infertility without any possibility of surgical correction [1]. It has emerged as a new type of transplant that provides an excellent option for women who lack a functional womb but desire to give birth [2,3].

Experimental models are paramount to study this transplant modality, and as the ewes' uteri are very similar to that of humans, they are frequently used with this purpose [4]. The aim of this study is to describe a novel technical variation for UTx in sheep.

METHODS

The study was conducted at the Laboratory of Medical Investigation 37 at the University of São Paulo School of Medicine in São Paulo, Brazil, and was approved by the local Ethics Committee of Animal Use (authorization number 063/16). Institutional guidelines for experimental animal care were strictly followed.

For this experiment, we used 3 adult sheep that weighed approximately 45 kg and were not pregnant. We performed the technique of uterine autotransplantation, that is, removal of the uterus, preserving its anatomic structures, and implantation in the same animal, but with revascularization of the organ by vascular anastomoses in a different place from the original.

This article was supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Estado de São Paulo - Grant number 2017/05389-4).

*Address correspondence to Rubens Macedo Arantes, Liver and Gastrointestinal Transplant Division, Department of Gastroenterology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil. Tel: (55 11) 2661-3323; Fax: (55 11) 2661-9007. E-mail: rmarantes@usp.br

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.
230 Park Avenue, New York, NY 10169

0041-1345/20
https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2020.02.040

8 REFERÊNCIAS

1. Brännström M, Belfort MA, Ayoubi JM. Uterus transplantation worldwide: clinical activities and outcomes. Current opinion in organ transplantation [Internet] 2021 [cited 2022 Feb 26];26(6):616–26. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34636769/
2. Brannstrom M. Current status and future direction of uterus transplantation. Current opinion in organ transplantation 2018;23(5):592–7.
3. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. Fertility and sterility. 2009;92(5):1520–4.
4. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroey P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. Human reproduction update 2008;14(6):605–21.
5. Matoba Y, Kisu I, Sera A, Yanokura M, Banno K, Aoki D. Current status of uterine regenerative medicine for absolute uterine factor infertility. Biomedical reports 2019;10(2):79–86.
6. Hur C, Rehmer J, Flyckt R, Falcone T. Uterine Factor Infertility: A Clinical Review. Clinical obstetrics and gynecology [Internet] 2019 [cited 2022 Feb 26];62(2):257–70. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31021928/
7. Hatasaka H. Clinical management of the uterine factor in infertility. Clinical obstetrics and gynecology [Internet] 2011 [cited 2022 Feb 26];54(4):696–709. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22031259/
8. Milliez J. Uterine transplantation FIGO Committee for the Ethical Aspects of Human Reproduction and Women's Health. International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics 2009;106(3):270.
9. Saso S, Clarke A, Bracewell-Milnes T, et al. Psychological Issues Associated With Absolute Uterine Factor Infertility and Attitudes of Patients Toward Uterine Transplantation. Progress in transplantation (Aliso Viejo, Calif) [Internet] 2016 [cited 2022 Feb 26];26(1):28–39. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27136247/
10. Söderström-Anttila V, Wennerholm UB, Loft A, et al. Surrogacy: outcomes for surrogate mothers, children and the resulting families-a systematic review. Human

reproduction update [Internet] 2016 [cited 2022 Feb 26];22(2):260–76. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26454266/

11. Resolução CFM N° 2.013/2013 - Conselho Federal de Medicina.
12. Jones BP, Ranaei-Zamani N, Vali S, et al. Options for acquiring motherhood in absolute uterine factor infertility; adoption, surrogacy and uterine transplantation. The obstetrician & gynaecologist : the journal for continuing professional development from the Royal College of Obstetricians & Gynaecologists [Internet] 2021 [cited 2022 Feb 26];23(2):138–47. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34248417/
13. Lavoue V, Vigneau C, Duros S, et al. Which Donor for Uterus Transplants: Brain-Dead Donor or Living Donor? A Systematic Review. Transplantation 2017;101(2):267–73.
14. Gauthier T, Garnault D, Therme J-F, et al. [Uterine transplantation: is there a real demand?]. Gynecologie, obstetrique & fertilite 2015;43(2):133–8.
15. Huppelschoten AG, van Dongen AJCM, Verhaak CM, Smeenk JMJ, Kremer JAM, Nelen WLDM. Differences in quality of life and emotional status between infertile women and their partners. Human reproduction (Oxford, England) 2013;28(8):2168–76.
16. Hsu P-Y, Lin M-W, Hwang J-L, Lee M-S, Wu M-H. The fertility quality of life (FertiQoL) questionnaire in Taiwanese infertile couples. Taiwanese journal of obstetrics & gynecology 2013;52(2):204–9.
17. Aarts JWM, Huppelschoten AG, van Empel IWH, et al. How patient-centred care relates to patients' quality of life and distress: a study in 427 women experiencing infertility. Human reproduction (Oxford, England) 2012;27(2):488–95.
18. Aarts JWM, van Empel IWH, Boivin J, Nelen WL, Kremer JAM, Verhaak CM. Relationship between quality of life and distress in infertility: a validation study of the Dutch FertiQoL. Human reproduction (Oxford, England) 2011;26(5):1112–8.
19. Johannesson L, Jarvholm S. Uterus transplantation: current progress and future prospects. International journal of women's health 2016;8:43–51.
20. Brannstrom M, Wranning CA, Racho El-Akouri R. Transplantation of the uterus. Molecular and cellular endocrinology 2003;202(1–2):177–84.
21. ZHORDANIA IF, GOTSIRIDZE OA. VITAL ACTIVITY OF THE EXCISED UTERUS AND ITS APPENDAGES AFTER THEIR. Acta chirurgiae plasticae 1964;6:23–32.
22. Eraslan S, Hamernik RJ, Hardy JD. Replantation of uterus and ovaries in dogs, with successful pregnancy. Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960) 1966;92(1):9–12.

23. Castellón LAR, Amador MIG, González RED, et al. The history behind successful uterine transplantation in humans. JBRA assisted reproduction [Internet] 2017 [cited 2021 Dec 7];21(2):126–34. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28609280/

24. Racho El-Akouri R, Kurlberg G, Dindelegan G, Molne J, Wallin A, Brannstrom M. Heterotopic uterine transplantation by vascular anastomosis in the mouse. The Journal of endocrinology 2002;174(2):157–66.

25. Racho El-Akouri R, Kurlberg G, Brannstrom M. Successful uterine transplantation in the mouse: pregnancy and post-natal development of offspring. Human reproduction (Oxford, England) 2003;18(10):2018–23.

26. Wranning CA, Marcickiewicz J, Enskog A, Dahm-Kahler P, Hanafy A, Brannstrom M. Fertility after autologous ovine uterine-tubal-ovarian transplantation by vascular anastomosis to the external iliac vessels. Human reproduction (Oxford, England) 2010;25(8):1973–9.

27. Mihara M, Kisu I, Hara H, et al. Uterine autotransplantation in cynomolgus macaques: the first case of pregnancy and delivery. Human reproduction (Oxford, England) 2012;27(8):2332–40.

28. Fageeh W, Raffa H, Jabbad H, Marzouki A. Transplantation of the human uterus. International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics 2002;76(3):245–51.

29. Brannstrom M, Johannesson L, Dahm-Kahler P, et al. First clinical uterus transplantation trial: a six-month report. Fertility and sterility 2014;101(5):1228–36.

30. Brannstrom M, Johannesson L, Bokstrom H, et al. Livebirth after uterus transplantation. Lancet (London, England) 2015;385(9968):607–16.

31. Ozkan O, Akar ME, Ozkan O, et al. Preliminary results of the first human uterus transplantation from a multiorgan donor. Fertility and sterility 2013;99(2):470–6.

32. Ejzenberg D, Andraus W, Baratelli Carelli Mendes LR, et al. Livebirth after uterus transplantation from a deceased donor in a recipient with uterine infertility. Lancet (London, England) 2019;392(10165):2697–704.

33. Castro F, Ejzenberg D, Pinheiro RS, et al. Uterus procurement from deceased donor for transplantation. Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation [Internet] 2021 [cited 2022 Feb 26];34(12):2570–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34668605/

34. Blume C, Pischke S, von Versen-Hoynck F, Gunter HH, Gross MM. Pregnancies in liver and kidney transplant recipients: a review of the current literature and recommendation. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology 2014;28(8):1123–36.

35. Ejzenberg D, Mendes LRBC, Haddad LB de P, Baracat EC, D'Albuquerque LAC, Andraus W. Uterine transplantation: a systematic review. Clinics (Sao Paulo, Brazil) 2016;71(11):679–83.

36. Erman Akar M, Ozkan O, Aydinuraz B, et al. Clinical pregnancy after uterus transplantation. Fertility and sterility 2013;100(5):1358–63.

37. Johannesson L, Kvarnstrom N, Molne J, et al. Uterus transplantation trial: 1-year outcome. Fertility and sterility 2015;103(1):199–204.

38. Marasco SF, Kras A, Schulberg E, Vale M, Lee GA. Impact of warm ischemia time on survival after heart transplantation. Transplantation proceedings [Internet] 2012 [cited 2022 Jan 25];44(5):1385–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22664020/

39. Tennankore KK, Kim SJ, Alwayn IPJ, Kiberd BA. Prolonged warm ischemia time is associated with graft failure and mortality after kidney transplantation. Kidney international [Internet] 2016 [cited 2022 Jan 25];89(3):648–58. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26880458/

40. Sirivatanauksorn Y, Taweerutchana V, Limsrichamrern S, et al. Recipient and perioperative risk factors associated with liver transplant graft outcomes. Transplantation proceedings [Internet] 2012 [cited 2022 Jan 25];44(2):505–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22410056/

41. Díaz-García C, Akhi SN, Martínez-Varea A, Brännström M. The effect of warm ischemia at uterus transplantation in a rat model. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica [Internet] 2013 [cited 2022 Jan 2];92(2):152–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23061896/

42. Zitkute V, Kvietkauskas M, Leber B, Strupas K, Stiegler P, Schemmer P. Ischemia and reperfusion injury in uterus transplantation: A comprehensive review. Transplantation reviews (Orlando, Fla) [Internet] 2020 [cited 2022 Feb 25];34(3). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32498979/

43. Dahm-Kahler P, Wranning C, Lundmark C, et al. Transplantation of the uterus in sheep: methodology and early reperfusion events. The journal of obstetrics and gynaecology research 2008;34(5):784–93.

44. Arantes RM, Nacif LS, Pinheiro RS, et al. Novel Technique in a Sheep Model of Uterine Transplantation. Transplantation proceedings [Internet] 2020 [cited 2021 Dec 13];52(5):1399–401. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32276834/

45. Diaz-Garcia C, Akhi SN, Wallin A, Pellicer A, Brannstrom M. First report on fertility after allogeneic uterus transplantation. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica 2010;89(11):1491–4.

46. Ramirez ER, Ramirez Nessetti DK, Nessetti MBR, et al. Pregnancy and outcome of uterine allotransplantation and assisted reproduction in sheep. Journal of minimally invasive gynecology 2011;18(2):238–45.

47. Andraus W, Ejzenberg D, dos Santos RMN, et al. Sheep model for uterine transplantation: The best option before starting a human program. Clinics 2017;72(3):178–82.

48. Solomonov E, Marcus Braun N, Siman-Tov Y, Ben-Shachar I. Team preparation for human uterus transplantation: Autologous transplantation in sheep model. Clinical transplantation [Internet] 2017 [cited 2021 Dec 16];31(12). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29032587/

49. Saso S, Petts G, Thum MY, et al. Achieving uterine auto-transplantation in a sheep model using iliac vessel anastomosis: a short-term viability study. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica [Internet] 2015 [cited 2021 Dec 16];94(3):245–52. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25421489/

50. Cicinelli E, Einer-Jensen N, Galantino P, Alfonso R, Nicoletti R. The vascular cast of the human uterus: from anatomy to physiology. Annals of the New York Academy of Sciences [Internet] 2004 [cited 2022 Feb 2];1034:19–26. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15731296/

51. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. Cellular Physiology and Biochemistry 2018;46(4):1650–67.

52. Ito T, Naini B v., Markovic D, et al. Ischemia-reperfusion injury and its relationship with early allograft dysfunction in liver transplant patients. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons [Internet] 2021 [cited 2022 Feb 27];21(2):614–25. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32713098/

53. Panteghini M. Aspartate aminotransferase isoenzymes. Clinical Biochemistry 1990;23(4):311–9.

54. McLeish MJ, Kenyon GL. Relating structure to mechanism in creatine kinase. Critical reviews in biochemistry and molecular biology [Internet] 2005 [cited 2022 Feb 2];40(1):1–20. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15804623/

55. Markert CL. Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. Cell Biochemistry and Function 1984;2(3):131–4.

56. Toffaletti JG. Blood lactate: Biochemistry, laboratory methods, and clinical interpretation. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 1991;28(4):253–68.

57. Robertson FP, Bessell PR, Diaz-Nieto R, et al. High serum Aspartate transaminase levels on day 3 postliver transplantation correlates with graft and patient survival and would be a valid surrogate for outcome in liver transplantation clinical trials. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation [Internet] 2016 [cited 2022 Feb 27];29(3):323–30. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26615011/

58. Adachi M, Kisu I, Nagai T, et al. Evaluation of allowable time and histopathological changes in warm ischemia of the uterus in cynomolgus monkey as a model for uterus transplantation. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica [Internet] 2016 [cited 2022 Feb 25];95(9):991–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27329637/

59. Diaz-Garcia C, Akhi SN, Martinez-Varea A, Brannstrom M. The effect of warm ischemia at uterus transplantation in a rat model. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica 2013;92(2):152–9.