

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina

Transplante hepático *large-for-size* porcino com arterialização parcial da veia porta: estudo hemodinâmico, histológico, bioquímico e biomolecular

Rafael Rodrigues Torres

São Paulo

2023

RAFAEL RODRIGUES TORRES

Transplante hepático *large-for-size* porcino com arterialização parcial da veia porta: estudo hemodinâmico, histológico, bioquímico e biomolecular

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

Programa: Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Torres, Rafael Rodrigues
Transplante hepático large-for-size porcino com
arterialização da veia porta : estudo hemodinâmico,
histológico, bioquímico e biomolecular / Rafael
Rodrigues Torres. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Ana Cristina Aoun Tannuri.

Descritores: 1.Transplante hepático 2.Large-for-
size 3.Arterialização 4.Lesão de isquemia e
reperfusão 5.Fluxo portal 6.Pressão portal

USP/FM/DBD-066/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e padrasto, Lais Rodrigues Torres Andrade, Carlos Astral Miranda Torres e Marco Antônio da Silva Andrade, pelo apoio e exemplos de perseverança e busca pela excelência.

À Profa. Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri, minha orientadora, pelo auxílio em todas as etapas da elaboração do trabalho e por nunca deixar que se extinguísse o entusiasmo necessário à conclusão do projeto.

Ao Prof. Dr. Uenis Tannuri, pela valiosíssima contribuição em minha formação como cirurgião pediátrico, além do exemplo de dedicação e perseverança.

Ao Dr. Alessandro Rodrigo Belon, cuja participação foi absolutamente essencial ao planejamento e execução dos experimentos.

À Srta. Suellen Serafini, que não apenas foi responsável pela preparação do material histológico, mas também contribuiu na organização de todo o projeto, com sua grande capacidade de planejamento e amizade nos momentos de dificuldade.

Ao Sr. Raimundo Renato Nunes Guimarães, por sua colaboração em todos os experimentos.

A Srta. Maria Cecília de Mendonça Coelho e Josiane de Oliveira Gonçalves, pela dedicação na execução dos estudos de biologia molecular.

À Sra. Patrícia Lopes Pereira, pela ajuda desde as fases mais iniciais da elaboração e adequação do projeto aos moldes da instituição.

Ao Dr. Celso di Loreto, pelas orientações e atenção na avaliação histológica.

Aos funcionários da Técnica Cirúrgica da FMUSP, Sr. Cláudio Antônio Vidotti, Sr. Lourival Rosa Coelho, Sra. Dulcineia Mariano e Sra. Junko Takano Osaka, pela ajuda na manipulação dos animais e pelo preparo do instrumental cirúrgico, tornando possível o desenvolvimento dessa tese.

À bibliotecária Sra. Erinalva Batista, por sua colaboração para os ajustes de formatação da tese.

Aos amigos Rodrigo Pavão, que participou na realização das análises estatísticas do projeto, além de Raphael Isaac Nishimoto, Guilherme Paganotti e Ana Caroline Dantas, que prestaram grande ajuda na execução dos procedimentos cirúrgicos.

RESUMO

Torres RR. Transplante hepático *large-for-size* porcino com arterialização da veia porta: estudo hemodinâmico, histológico, bioquímico e biomolecular [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: No transplante hepático, o tamanho ideal do fígado transplantado varia entre 0,8% e 4% do peso do receptor (*graft to body weight ratio* – GBWR). Em transplantes de crianças com menos de 10Kg frequentemente o enxerto tem peso maior que 4% do peso do receptor. Esta desproporção é usualmente denominada de *large for size*. Em situações como essa, ocorre hipofluxo na veia porta, o que pode piorar a chamada lesão de isquemia/reperfusão (LIR). A LIR é uma resposta inflamatória mediada pelas células de Kupffer, através da liberação de espécies reativas de oxigênio no parênquima hepático e do recrutamento de polimorfonucleares sistêmicos e linfócitos T-CD4+, que perpetuam a lesão mesmo após o restabelecimento do fluxo sanguíneo. Considerando que o hipofluxo é um fator de piora da LIR nos enxertos *large for size*, pode haver benefício no aumento do fluxo e da oxigenação portal através de uma anastomose entre o sistema porta e o sistema arterial, procedimento conhecido como arterialização da veia porta. Este é um estudo experimental usando porcos, que são considerados um modelo adequado para o estudo de resultados de transplante hepático, especialmente no que se refere à lesão de isquemia/reperfusão. **Objetivos:** Avaliar se a arterialização da veia porta reduz a LIR em transplantes com enxertos tipo *large for size*. Investigar a associação entre parâmetros hemodinâmicos e os parâmetros representativos da lesão de isquemia e reperfusão. **Metodologia:** Realizamos quinze transplantes hepáticos em porcos, com enxertos de doadores com peso cerca de 60% maior que o receptor. Em nove desses transplantes, estabelecemos uma comunicação entre a veia porta e a artéria esplênica através de um cateter. Avaliamos parâmetros hemodinâmicos, histológicos e da expressão de genes e marcadores bioquímicos da LIR. **Resultados:** A arterialização resultou num aumento significativo da pressão portal, mas não alterou outras variáveis hemodinâmicas, como demonstrado na análise de variância. A maior expressão dos genes de IL6 e cFOS, além de uma menor expressão do gene da ICAM no grupo arterializado, indicam que a arterialização pode ter um papel protetor na lesão de isquemia e reperfusão. A análise de regressão sugeriu interferência positiva do fluxo e pressão portal sobre os parâmetros bioquímicos. **Conclusões:** A arterialização da veia porta não reduziu a LIR, mas demonstrou benefícios discretos em aspectos moleculares durante a fase de reperfusão, no contexto do transplante *large-for-size*.

Palavras-chave: Transplante hepático. Large-for-size. Arterialização. Lesão de isquemia e reperfusão. Fluxo portal. Pressão portal.

ABSTRACT

Torres RR. Experiential large-for-size porcine liver transplant with portal vein arterialization: investigation into hemodynamic, histological biochemical and molecular changes [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Introduction: In liver transplantation, the optimal graft size ranges between 0.8% and 4% of the recipient's body weight (*graft to body weight ratio* – GBWR). However, grafts are often larger than 4% of the body weight when the recipient is a child weighting less than 10kg. Usually, we call this disproportion *large for size*. In this situation, there is a relative hypoperfusion in the portal vein territory, which could worsen the ischemia/reperfusion injury (IRI). IRI is a Kupffer cell-mediated inflammatory response due to the release of reactive oxygen species in the liver parenchyma and recruitment of polymorphonuclear leukocytes and T CD4+ lymphocytes, perpetuating the injury even after blood flow is reestablished. Since hypoperfusion tends to aggravate the ischemia/reperfusion lesion in the *large for size* graft, increasing portal blood oxygenation by establishing an anastomosis between the portal system and the arterial system could be beneficial – this is called portal vein arterialization. This is an experimental study using pigs, which are considered a good model for the assessment of liver transplant results in general and, specifically, ischemia/reperfusion injury. **Objectives:** To test if portal vein arterialization reduces ischemia/reperfusion injury, in transplants with *large for size* grafts. Investigate the association between hemodynamic parameters and parameters representative of ischemia and reperfusion injury. **Methods:** Fifteen transplants were performed in pigs, using grafts from donors weighting about 60% more than the recipient. In nine of these transplants, a catheter was used to establish a communication between the portal vein and the splenic artery. Hemodynamic and histologic parameters, gene expression and biochemical markers of IRI were assessed. **Results:** Performing arterialization resulted in a significant increase in portal vein pressure, but did not cause changes in other hemodynamic variables, as shown in the analysis of variance. The greater expression of the IL6 and cFOS genes, in addition to a lower expression of the ICAM gene in the arterialized group, indicate that arterialization may have a protective role in ischemia and reperfusion injury. The regression analysis suggested a positive influence of portal flow and pressure on biochemical parameters. **Conclusion:** Arterialization of the portal vein did not reduce de ischemia reperfusion injury, but showed discrete benefits related to molecular aspects during the reperfusion phase in the context of large-for-size transplantation.

Keywords: Liver transplant. Large-for-size. Arterialization. Ischemia reperfusion injury. Portal flow. Portal pressure.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanina aminotransferase
ART	Grupo arterializado
AST	Aspartato aminotransferase
AVB	Atresia das vias biliares
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK	Célula de Kupffer
CTRL	Grupo controle
eNOS	óxido-nítrico sintetase endotelial
FC	Frequência cardíaca
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GBWR	<i>Graft to body weight ratio</i>
HE	Hematoxilina-eosina
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IIR	Índice de isquemia e reperfusão
IL	Interleucina
iNOS	óxido nítrico sintetase induzível
LIR	Lesão de isquemia/reperfusão
LFS	<i>Large-for-size</i>

LIM	Laboratório de Investigação Médica
NO	Óxido nítrico
PAM	Pressão arterial média
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVC	Pressão venosa central
PVP	Pressão na veia porta
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
TNF	<i>Tumoral necrosis fator</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Cirurgia do doador	30
Figura 2 Cirurgia do receptor	32
Figura 3 Ordem das anastomoses.....	32
Figura 4 Representação esquemática do cateter de arterialização	33
Figura 5 Medida do fluxo. À esquerda, transdutores acoplados à veia porta e artéria hepática. À esquerda o fluxômetro.	35
Figura 6 Alterações histológicas. A: Necrose. As setas apontam o desarranjo da arquitetura do parênquima (Aumento de 10x); B: Esteatose. É possível observar as gotículas de acúmulo de lipídios (Aumento de 20x); C: Inflamação: as setas apontam os neutrófilos (Aumento de 40x e zoom da câmera); D: Edema. Os círculos mostram a diferença entre a porção do tecido normal (esquerda) e tecido com edema celular (direita). (Aumento de 20x).	37
Figura 7 Dados de pressão nos instantes 2, 5, 8 e 9.....	47
Figura 8 Dados de fluxo nos instantes 2, 5, 8 e 9.....	47
Figura 9 Fluxo portal 1 hora e 3 horas após reperfusão / arterialização.....	48
Figura 10 Fluxo na artéria hepática 1 hora e 3 horas após reperfusão / arterialização.	48
Figura 11 Fluxos por massa 1 e 3 horas após reperfusão / arterialização.	49
Figura 12 Pressão medida na veia porta e no sistema de arterialização 1 hora após a reperfusão.....	50
Figura 13 Pressão medida na veia porta e no sistema de arterialização 3 horas após a reperfusão.....	51
Figura 14 Dados histológicos nos instantes 3, 8 e 9.....	52
Figura 15 Necrose 1 e 3 horas após reperfusão / arterialização.....	53
Figura 16 Esteatose 1 e 3 horas após a reperfusão / arterialização.....	53
Figura 17 Inflamação 1 e 3 horas após a reperfusão / arterialização.	54
Figura 18 Edema 1 e 3 horas após reperfusão / arterialização.....	54
Figura 19 Índice de Isquemia e Reperfusão (IIR) 1 e 3 horas após a reperfusão / arterialização.	55
Figura 20 Dados bioquímicos. 1-basal do doador; 2-após dissecação dos vasos; 4-basal do receptor; 5-após dissecação dos vasos (receptor); 7-logo após reperfusão; 8-uma hora após reperfusão; 9-três horas após reperfusão.....	56
Figura 21 ALT 1 e 3 horas após reperfusão / arterialização.....	56
Figura 22 AST 1 e 3 horas após reperfusão / arterialização.	57
Figura 23 Dados moleculares: ICAM, eNOS, IL6 e TNF nos instantes 3, 7, 8 e 9.	58
Figura 24 Dados moleculares: BAX, BCL-XL, cFOS e cJUN nos instantes 3, 7, 8 e 9.	58
Figura 25 IL-6 1 e 3 horas após reperfusão / arterialização.....	59
Figura 26 ICAM 1 e 3 horas após reperfusão / arterialização.....	59
Figura 27 c-FOS 1 e 3 horas após reperfusão / arterialização.....	60

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 GERAL	24
2.2 ESPECÍFICO	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 AMOSTRA.....	25
3.1.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	25
3.1.2 RECEPTOR	25
3.1.3 DOADOR	25
3.1.4 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	26
3.2 ANESTESIA E CIRURGIA	27
3.2.1 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO	27
3.2.2 CIRURGIA DO DOADOR	28
3.2.3 CIRURGIA NA BANDEJA	30
3.2.4 CIRURGIA DO RECEPTOR	30
3.3 MÉTODOS DE ANÁLISE.....	34
3.3.1 ANÁLISE DOS PROCEDIMENTOS E ANIMAIS	34
3.3.2 ANÁLISE HEMODINÂMICA	34
3.3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	35
3.3.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA	37
3.3.5 ANÁLISE MOLECULAR.....	38
3.3.5.1 Extração de ARN.....	38
3.3.5.2 Transcrição Reversa	39
3.3.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa Quantitativa (qRT-PCR).....	39
3.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4 RESULTADOS	45

4.1 DADOS HEMODINÂMICOS	46
4.2 DADOS HISTOLÓGICOS.....	51
4.3 DADOS BIOQUÍMICOS.....	55
4.4 DADOS MOLECULARES.....	57
4.5 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA)	60
4.6 REGRESSÃO.....	61
<u>5 DISCUSSÃO</u>	<u>64</u>
<u>6 CONCLUSÃO</u>	<u>71</u>
<u>7 FINANCIAMENTO E OUTROS APOIOS.....</u>	<u>71</u>
<u>REFERÊNCIAS.....</u>	<u>72</u>

1 INTRODUÇÃO

Na população pediátrica, as principais etiologias das doenças hepáticas que levam à necessidade de transplante podem ser separadas nos seguintes grupos: **doenças colestáticas**, ou seja, que afetam o escoamento nas vias biliares. Dentre estas, destacam-se a atresia de vias biliares (AVB) e a síndrome de Alagille. **Doenças metabólicas**, como por exemplo a deficiência de α -1 antitripsina e doença de Wilson. **Lesões inflamatórias agudas**, como as hepatites viral e autoimune. E as **neoplasias**, como o hepatoblastoma ou o carcinoma hepatocelular.

Dentre estas, sem dúvida, a AVB é a etiologia mais frequente, responsável por 50 a 70% das indicações de transplante em crianças. A causa da AVB ainda é pouco conhecida, mas sabe-se que ocorre um processo inflamatório progressivo, pós-natal, nos ductos biliares, levando a obstrução, cirrose biliar e, por fim, insuficiência hepática. A portoenterostomia a Kasai é um procedimento que, se realizado precocemente, pode resolver ou atenuar a colestase. Para uma minoria de pacientes, este procedimento é permanentemente resolutivo. Mas na maioria das vezes, a cirurgia de Kasai apenas protela a necessidade do transplante. Mesmo assim, na realidade brasileira, a maioria dos pacientes chega aos centros de transplante sem ter sido operada.

Na evolução natural da AVB, as consequências da cirrose e falência hepática levam o paciente a óbito em torno de 18 a 24 meses. A indicação do transplante deve levar em consideração a condição atual do paciente e a velocidade de progressão da doença. Em geral, o transplante é indicado antes do primeiro ano de vida, ou seja, em pacientes com menos de 10kg.

Os tipos de transplante hepático conhecidos atualmente são o transplante de doador cadavérico (órgão inteiro ou parte do órgão), transplante com doador vivo e xenotransplante. Este último é o transplante de órgão de doador de espécie diferente do receptor. Atualmente ainda em fase experimental.

O transplante hepático com doador vivo foi desenvolvido seguindo-se a constante necessidade de uma demanda crescente de enxertos para transplantes na Europa, América do Norte e Japão. Neste último, o conceito de morte encefálica não era reconhecido até o final da década de 80, o que deixou como única opção para as crianças

os enxertos oriundos de doadores vivos. No mundo, o primeiro caso com sucesso descrito desta modalidade de transplante foi realizado por Raia *et al* em 1989, em uma criança de 19 meses de vida que recebeu um enxerto hepático de um doador de 40 anos.(1)

Para os pacientes pediátricos, principalmente no caso da atresia das vias biliares, a indicação do transplante ocorre, na maioria das vezes, num momento em que a função hepática ainda não está tão comprometida. Isso diminui a prioridade desses pacientes nas listas de espera por um doador cadáver. Dessa forma, a rotina do transplante hepático pediátrico se baseia no transplante de doadores vivos, que em geral são os pais, quando apresentam compatibilidade do sistema ABO e não têm fatores anatômicos ou patológicos que inviabilizem a doação.

A porção do fígado normalmente retirada do doador é o segmento lateral esquerdo, que consiste nos segmentos II e III, ou o lobo esquerdo, segmentos II a IV segundo a classificação de Couinaud. O segmento lateral esquerdo é a porção utilizada com mais frequência e isso equivale a uma massa entre 170 e 400g. Na maioria das vezes, o segmento lateral esquerdo tem massa em torno de 300g.

Um aspecto importante do transplante hepático é a relação entre os tamanhos do enxerto e do receptor. Percebe-se que uma desproporção pode levar a maiores índices de morbidade, mortalidade e perda do enxerto. Principalmente no momento da reperusão, o fluxo e a oxigenação do enxerto tendem a ser proporcionalmente menores, prejudicando seu funcionamento, além de causar um desequilíbrio hemodinâmico no receptor.(2-4)

Idealmente, a massa do enxerto hepático deve ter entre 0,8 e 4% da massa corporal do receptor. Essa é a chamada razão do enxerto para o peso corporal, do inglês *graft to body weight ratio – GBWR*. Quando se implanta um enxerto com GBWR abaixo de 0,8%, ou seja, *small-for-size*, pode haver um período de insuficiência hepática no receptor. Isso é frequente nos transplantes realizados em adultos, principalmente com doadores vivos, já que a massa hepática doada é limitada.

Nos pacientes pediátricos, a condição oposta é mais frequente, ou seja, o enxerto *large-for-size*, que tem GBWR acima de 4%, já que a oferta de enxertos é

predominantemente de adultos. A captação do segmento hepático deve respeitar a anatomia vascular e a arquitetura dos ductos biliares e, portanto, os segmentos doados não podem ser reduzidos de maneira irrestrita.

Como consequência a um transplante *large-for-size*, são frequentes uma reperfusão dificultada, síndrome compartimental abdominal e, no longo prazo, índices maiores de rejeição celular aguda, trombose da veia porta, complicações biliares e maior possibilidade de perda do enxerto(5, 6).

Na literatura, não há tantas informações sobre detalhes da síndrome ou condição *large-for-size* quanto no transplante hepático *small-for-size*. Certamente, a menor frequência de transplantes pediátricos desfavorece a casuística para caracterização da síndrome do ponto de vista clínico e laboratorial. Em 2021, de um total de 2.033 transplantes hepáticos realizados no Brasil somente 235 foram em crianças. Algumas séries de casos e trabalhos experimentais descrevem o *large-for-size*, associando o tamanho do enxerto como variável determinante para o desfecho deletério no resultado do transplante. Outros descrevem a síndrome tão somente como uma questão de continente *versus* conteúdo, de maneira que todos os efeitos mórbidos podem ser resolvidos com o uso de telas ou manutenção temporária da cavidade abdominal aberta. Os trabalhos presentes na literatura não deixam claro se os prejuízos da síndrome *large for size* se devem a um menor aporte de oxigênio, por um hipofluxo relativo, ou se existem outras repercussões no longo prazo, além da perda de hepatócitos.(7-9)

Além de um baixo fluxo relativo devido à desproporção de tamanho, o hipofluxo absoluto também pode ser um problema nos pacientes cirróticos. Com o desenvolvimento de colaterais, típico nesses pacientes, como forma de adaptação à doença, é frequente encontrar baixo fluxo e baixa pressão na veia porta isoladamente, no momento da reperfusão.

Existem relatos na literatura sobre procedimentos realizados com o objetivo de aumentar o fluxo e o aporte de oxigênio na veia porta, através da chamada arterialização do sistema porta. A partir da década de 50, surgem relatos sobre esse procedimento, que foi utilizado no contexto da cirrose hepática, com derivação portocava. Otte et al, em 1982, apresentam relato de 75 pacientes submetidos a derivação portocava. Dentre

estes, 62 apresentavam fluxo hepatopetal e foram submetidos a arterialização da veia porta.(10)

Alguns trabalhos sugerem que a hiperoxigenação do fígado melhora a capacidade regenerativa. Nardo et al demonstraram aumento da PO₂ no sangue portal, bem como redução mais significativa dos níveis de ALT e da necrose, em modelo com ratos submetidos a arterialização da veia porta após indução de insuficiência hepática aguda, em relação aos controles, que não foram submetidos ao procedimento de arterialização.(11)

Diversos estudos em animais mostram que o aumento do aporte de oxigênio para o fígado através da arterialização da veia porta aumenta a capacidade regenerativa após a hepatectomia.(11-14) A alta saturação de oxigênio no fluxo portal parece melhorar o metabolismo oxidativo nos hepatócitos, suprimindo assim os processos de regeneração, que demandam grande quantidade de energia. Shao-Hua Guo et al demonstraram efeitos benéficos da arterialização da veia porta sobre a proliferação celular do ducto biliar após a ligadura da artéria hepática, em experimento com ratos(15).

Bhangui, P. et al e Majlesara, A. et al descrevem alguns casos bem-sucedidos de arterialização de veia porta utilizada como procedimento de resgate após transplante hepático em pacientes com trombose de artéria hepática ou pacientes submetidos a grandes ressecções por tumores hepatobiliares, resultando em ligadura da artéria hepática.(14, 16) Em alguns casos, a arterialização foi suficiente para manter a perfusão hepática adequada. Em outros, serviu como ponte para que o retransplante pudesse ser realizado em situação eletiva e mais favorável.

Em um estudo com cães, Ogata et al concluíram que a arterialização portal parcial, usando um shunt arteriovenoso esplênico pode reduzir a disfunção hepática e inibir o aumento de endotoxinas plasmáticas, a curto prazo, após uma hepatectomia ampliada, presumidamente letal. Esses efeitos poderiam melhorar a regeneração hepática após hepatectomia extensa. Neste experimento, não houve aumento significativo da pressão no sistema porta, em relação ao grupo submetido apenas à hepatectomia.(12)

Em outro estudo semelhante usando modelo com ratos, Shimizu et al concluem que após a arterialização da veia porta, o fluxo e aporte de oxigênio no sistema porta aumentam. Esse aumento tem efeitos benéficos sobre o metabolismo energético do fígado, bem como na capacidade de regeneração, e promove maior sobrevida. Esse estudo sugere que a arterialização da veia porta pode ser uma técnica clinicamente útil para evitar a insuficiência hepática após hepatectomia(13).

O conceito de arterialização da veia porta não é homogêneo nas suas diversas publicações. Alguns autores a descrevem como total, ou seja, o fluxo portal é totalmente substituído por um fluxo arterial. Outros descreverem um shunt que soma uma irrigação arterial ao fluxo portal, ou seja, uma arterialização parcial. Em alguns casos, a arterialização foi utilizada em fígado totalmente desprovido de fluxo na artéria hepática e em outros, em órgãos com fluxo portal e arterial. Entretanto, os resultados conseguidos com este procedimento em diversos aspectos fisiopatológicos do fígado, bem como a associação dos problemas do transplante *large for size* à baixa perfusão, motivaram o estudo dos efeitos da arterialização sobre a perfusão de um enxerto *large for size*. Neste trabalho, em especial, tivemos como foco principal a lesão de isquemia/reperfusão. E sobre esse fenômeno, cabe uma breve discussão.

Depois da abertura dos clampes, se inicia a reperfusão do enxerto, e, com isso, tem início um fenômeno inflamatório complexo, que leva a lesão do endotélio e morte celular por apoptose e necrose(17). Esse processo é a lesão de isquemia e reperfusão(17) (LIR), que inicialmente é mediada pela célula de Kupffer (18)(CK), que libera radicais oxidativos, e se mantém pela lesão endotelial, perfusão deficiente e danos ao parênquima hepático. O desequilíbrio entre vasoconstrição e vasodilatação, controladas pelas endotelinas e pelo óxido nítrico (NO) é um dos determinantes da intensidade dessa lesão(19).

Os eventos intracelulares se iniciam por estímulos de citocinas, como as do grupo do TNF- α , que ativam sinalizadores participantes na apoptose, como citocromo C e caspases (*cysteine asparagil specific proteases*). As caspases desnaturam proteínas celulares vitais e ativam endonucleases. Essa cadeia de eventos acaba levando à destruição do material genético e morte celular.

A ativação destas proteases ocorre pelas vias extrínseca e intrínseca. A primeira é uma resposta a citocinas extra-celulares que ativam principalmente os receptores do TNF.

A produção de citocinas inflamatórias está associada à expressão de alguns genes estudados neste trabalho, dentre eles c-fos e c-jun, também associados ao reparo tecidual e apoptose. Esses genes são ativados por diversos estímulos extra-celulares, como radicais oxidativos, peróxido de hidrogênio e outras citocinas. Outros trabalhos da literatura mostram associação da expressão desses genes com a intensidade da LIR no fígado(20).

A via intrínseca resulta do aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma. Esse processo é regulado pelas moléculas da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma*). Essa família é constituída por genes e por proteínas originadas a partir desses genes que têm função tanto anti-apoptótica quanto pró-apoptóticas. Entre os genes e as proteínas a que estes genes dão origem destacam-se a Bcl-2 e Bcl-XL com efeito anti-apoptótico, enquanto o papel pró-apoptótico é desempenhado principalmente pelas Bak (*Bcl-2 associated killer*) e Bax (*Bcl-2 associated x protein*). Dessa forma, quando os níveis de Bcl-2 e Bcl-XL caem, a permeabilidade da membrana mitocondrial aumenta o que leva a liberação de proteínas ativadoras da cadeia proteolítica para o citoplasma, dentre elas, destaca-se o citocromo C, que atua ativando a cascata das caspases.(21)

Na fase de execução da apoptose ocorre ativação das endonucleases, quebra da cromatina nuclear e do citoesqueleto. Há fragmentação da célula com a formação de corpos apoptóticos, constituídos de citoplasma, resto de organelas e fragmentos nucleares.(22)

A CK também é estimulada pela isquemia fria. Esta célula libera citocinas inflamatórias que atraem neutrófilos e linfócitos(23), dentre elas, IL-6, IL-1 e TNF- α . Esses leucócitos mantem a LIR pela produção de mais fatores inflamatórios no tecido, entre eles os radicais oxidativos. Alguns estudos indicam que a modulação da atividade da CK poderia melhorar a LIR no fígado.

Os polimorfonucleares surgem no tecido hepático já nas fases iniciais da LIR. Sua migração ocorre pelo surgimento de moléculas de adesão intercelular (*Intercellular adhesion molecules* - ICAM). A maior expressão dessas moléculas na superfície da célula endotelial é influenciada pela IL-1 e TNF- α . A atividade dos genes produtores de ICAM pode ser quantificada e se correlaciona positivamente a maior taxa de rejeição celular aguda e LIR.

Durante a reperfusão, em questão de minutos ou poucas horas, esses eventos provocam edema celular nos hepatócitos, além de acúmulo de células inflamatórias e debris celulares e, conseqüentemente, temos redução do calibre dos sinusóides hepáticos, de maneira heterogênea, em todo o órgão. Portanto a reperfusão ocorre de modo errático e não homogêneo, com áreas mal vascularizadas que perpetuam a LIR(24, 25). Soma-se a isso um desequilíbrio entre vasoconstrição, causada pelas endotelinas, e vasodilatação, causada pelo óxido nítrico, caracterizando o fenômeno *no-reflow*, em que algumas áreas de parênquima continuam isquêmicas, mesmo após o pleno restabelecimento das condições hemodinâmicas do indivíduo.

O óxido nítrico tem ação vasodilatadora na microvasculatura. Sua produção ocorre por ação da óxido nítrico sintetase (NOS). Esta enzima possui as isoformas neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS).

Experimentos em animais indicam que a eNOS tem papel protetor do fígado durante a LIR. Camundongos *knockout* (técnica na qual um dos genes do organismo é tornado inativo) para eNOS(-/-) mostram uma lesão mais intensa após isquemia hepática quente quando comparados com seus semelhantes selvagens, *wild type*. De maneira semelhante, animais eNOS(-/-) também mostraram maior dano hepático após isquemia fria e reperfusão quente em um modelo de transplante hepático murino.(26)

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

Do ponto de vista histológico, a lesão de isquemia e reperfusão se expressa através da necrose, esteatose, inflamação e edema. Esses achados são identificáveis através de microscopia óptica e coloração com hematoxilina-eosina. A necrose se caracteriza pelo desarranjo tecidual e lise celular. É o padrão predominante de morte celular. Junto com a necrose, também é possível observar a apoptose, caracterizada pela presença de corpos apoptóticos.

A esteatose hepática se manifesta pela presença de vesículas lipídicas no interior do hepatócito. O acúmulo de lipídeos no interior do hepatócito ocorre por um desequilíbrio de quaisquer das etapas de captação, catabolismo e secreção. A hipoxia e a lesão de isquemia e reperfusão podem ser responsáveis por esse desequilíbrio.

A inflamação se caracteriza pelo número aumentado de neutrófilos no tecido hepático. E o edema celular é visível pelo aumento do volume celular, causando uma distorção da arquitetura do hepatócito.

A lesão celular hepática leva ao aumento de TGO e TGP no sangue. E o sofrimento tecidual do indivíduo, causado pelo estresse metabólico experimentado durante o procedimento cirúrgico, leva ao aumento de lactato e redução de pH.

No presente trabalho, utilizamos um modelo em porcos, conforme já utilizado em trabalhos semelhantes, executados no mesmo laboratório. O porco é um animal frequentemente utilizado para estudos relativos ao transplante hepático devido a diversas semelhanças anatômicas e fisiológicas com o ser humano nesse aspecto.(27)

Kobayashi et al descrevem a experiência da Jichi Medical University, em uma revisão publicada em 2012. Os autores destacam as similaridades anatômicas e fisiológicas entre porcos e seres humanos, além da facilidade de obtenção e custo relativamente baixo destes animais, por já terem um uso bem estabelecido como alimento.(28)

Leal et al, em estudo realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, descrevem em 2013 um modelo porcino para estudo dos efeitos de um transplante *large for size*. Este modelo mostrou-se adequado para o estudo desse tipo de condição.(27)

Os mesmos autores, em 2015, descrevem um modelo porcino para o estudo dos efeitos do pré-condicionamento isquêmico, em transplante de fígado usando enxertos *large for size*, em trabalho realizado no laboratório de cirurgia experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os autores concluem que pode haver atenuação parcial da lesão de isquemia-reperfusão, quando o fígado é submetido a um pré condicionamento isquêmico, com interrupção do fluxo hepático por 15 minutos, ainda no doador.(29)

Moreira et al, em experimento realizado no mesmo laboratório em 2016, demonstraram a redução significativa que ocorre no fluxo portal após o transplante hepático realizado com enxertos do tipo *large for size* em porcos. No mesmo estudo, foi medido o fluxo portal após a realização de shunt venoso entre a veia cava inferior e a veia porta, não havendo aumento significativo deste fluxo.(21)

O presente estudo é parte da linha de pesquisa dos estudos citados anteriormente da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, realizado conjuntamente nos Laboratórios de Investigação Médica de Cirurgia Pediátrica (LIM-30) e de Cirurgia Experimental (LIM-26). Possui por finalidade aumentar o conhecimento a respeito dos fluxos vasculares hepáticos em um modelo de transplante hepático porcino *large-for-size*, sua relação com aumento da lesão de isquemia e reperfusão hepática, além de caracterizar os efeitos de uma comunicação entre o sistema arterial e a veia porta no aumento do fluxo venoso portal e na respectiva lesão de isquemia/reperfusão. O modelo proposto para a arterialização é de execução relativamente simples, assim como é simples a possibilidade de sua interrupção. Isso tem importância quando se propõe efeito transitório e uma permanência breve e por tempo definido da condição arterializada. De fato, essa é uma das principais características deste trabalho de pesquisa, qual seja, a verificação, em campo, numa situação real, da aplicabilidade da arterialização.

Os resultados deste experimento demonstrarão o real benefício ou prejuízo causado pelo procedimento de arterialização da veia porta. A médio prazo, este trabalho pode justificar a continuidade de outros estudos e modelos de arterialização do sistema

portal e, a longo prazo, justificar o uso de um novo recurso na prática cirúrgica, a fim de vencer algumas das dificuldades existentes no transplante hepático.

Este trabalho foi publicado no *Journal of Investigative Surgery* com o título ***Does Arterialization of Portal Vein Have Any Effects in Large-for-Size Liver Transplantation? Hemodynamic, Histological, and Biomolecular Experimental Studies.***(30)

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Testar se a arterialização da veia porta reduz a lesão de isquemia e reperfusão no enxerto *large-for-size* quando comparado a um enxerto semelhante que não é submetido à arterialização.

2.2 Específico

Investigar a existência de uma associação entre as variáveis hemodinâmicas, passíveis de modificação (variáveis explicativas), e as variáveis histológicas, bioquímicas e moleculares (variáveis de desfecho).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostra

3.1.1 Considerações éticas

Todos os animais foram manipulados de acordo com as normas para a prática didático-científico da vivisseção brasileira, Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 que regulamentam os procedimentos com animais submetidos a pesquisa científica e a resolução nº 714 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) que regula os procedimentos de eutanásia.

Este projeto teve o apoio institucional do Laboratório de Investigação Médica em Cirurgia Pediátrica (LIM 30) da FMUSP e do Laboratório de Investigação Médica em Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental (LIM 26) da FMUSP. Vários equipamentos, como aqueles necessários à análise histológica, bioquímica e das fases iniciais dos estudos de biologia molecular, já estavam disponíveis nos laboratórios envolvidos.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em reunião de 08 de junho de 2016, sob o número 051/16.

3.1.2 Receptor

A amostra dos receptores foi composta de animais recém desmamados do sexo masculino e feminino, saudáveis, com peso variando entre 15 Kg e 21 Kg, híbridos das raças Landrace e Large-White.

3.1.3 Doador

Os doadores, em ambos os grupos, eram porcos com peso variando entre 34 e 50 Kg.

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Cirúrgica (LIM 26) e no Laboratório de Investigação em Cirurgia Pediátrica (LIM 30) da FMUSP.

Os animais foram adquiridos através desses mesmos Laboratórios de Investigação Médica da FMUSP.

Foram fornecidas água e dieta *ad libitum* até 12 horas antes do procedimento.

3.1.4 Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho amostral calculado foi de 14 transplantes, obtido considerando o teste ANOVA two-way (medidas repetidas com dois fatores) com nível de significância de 5%, poder do teste de 95%, tamanho do efeito de 0.90, com 2 grupos e 3 medidas ao longo do tempo considerando como referência a variável IIR. O cálculo amostral foi obtido utilizando o software “G*power versão 3.1.9.2”.

Segue a saída do programa:

F tests - ANOVA: Repeated measures, between factors

Analysis: A priori: Compute required sample size

Input: Effect size f = 0.90

α err prob = 0.05

Power (1- β err prob) = 0.95

Number of groups = 2

Number of measurements = 3

Corr among rep measures = 0.5 (*)

Output: Noncentrality parameter λ = 17.0100000

Critical F = 4.7472253

Numerator df = 1.0000000

Denominator df = 12.0000000

Total sample size = 14

Actual power = 0.9653539

O tamanho do efeito (effect size f) é a diferença das médias da variável em questão.

* Coeficiente de correlação entre os 2 grupos para uma mesma variável no eixo x (grupo A) e y (grupo B). Varia entre -1 e 1.

Foram realizados 9 transplantes no grupo ART e 6 transplantes no grupo CTRL. Inicialmente, trabalhamos com 12 transplantes em cada grupo. Porém, houve perdas de animais em ambos os grupos e, por se tratar de experimento com custo significativo para as possibilidades do laboratório, optamos por aceitar essa redução, já que ainda se adequava ao valor calculado para o grupo amostral. No grupo controle, com o transplante feito de forma convencional, a variabilidade de resultados foi menor, o que tornou aceitável a execução com menos indivíduos.

3.2 Anestesia e Cirurgia

3.2.1 Procedimento anestésico

Os animais receberam injeção intramuscular de Xilazina (2 mg/Kg) e Ketamina (10mg/Kg) como medicação pré-anestésica 30 minutos antes da indução anestésica. Após a sedação, os animais foram pesados e então posicionados em mesa cirúrgica em decúbito dorsal. A indução anestésica foi feita com 3 a 5mg/kg de Propofol, por injeção em veia periférica na orelha, com Jelco 20G. Os animais foram intubados com cânula 7 a 9, a depender do peso. Essas etapas iniciais eram executadas em todos os animais, de ambos os grupos.

A ventilação mecânica e anestesia inalatória foram mantidas com aparelho de anestesia InterMed® Interlinea A, com administração de Isoflurano 1,5 a 2,5% e Fentanil (0,1µg/Kg/min) em bomba de infusão contínua. Cardioscópio, oxímetro de pulso, capnógrafo e termômetro esofágico foram usados para monitorização, além da medida de pressão arterial e venosa central, medidas através de cateteres instalados por dissecação. Na veia jugular, utilizamos sonda 10 Fr, também utilizada para coleta de

exames e infusão de fluidos. A artéria carótida foi cateterizada com sonda 8 Fr, que também foi usada para coleta de gasometria arterial.

3.2.2 Cirurgia do Doador

As cirurgias foram executadas todas pelo mesmo cirurgião principal, com auxílio de membros sempre do mesmo grupo. Utilizamos lupa cirúrgica com aumento de 2,5 vezes.

A cirurgia do doador era iniciada por incisão xifopúbica. O afastador de Gosset foi utilizado na posição mais cranial da abertura.

Inicialmente, os ligamentos hepáticos eram seccionados. Em seguida, fazíamos a dissecação do hilo hepático, com isolamento da veia porta, artéria hepática e colédoco. Após a dissecação das estruturas vasculares, a coleta de dados se iniciava, com medidas de fluxo da veia porta e artéria hepática, medidas de pressão portal através de punção com Jelco 20G, além de medidas de pressão arterial sistêmica e coleta de amostras para exames de sangue. Também neste momento eram colhidas duas amostras de biópsia para armazenamento em RNALater® (ThermoFisher Scientific inc.) e formol 10.

Os dados da monitorização foram coletados a partir do monitor multi-parâmetros (Dx2020, Dixtal Biomédica) e anotados na tabela de campo. Os fluxos sanguíneos foram aferidos em mL/min através do fluxômetro (T402, Transonic, EUA) e anotados em campo específico na mesma tabela. As amostras de sangue da gasometria eram encaminhadas e processadas imediatamente no gasômetro (ABL800 Flex, Radiometer).

O preparo para a captação do enxerto continuava com a cateterização da veia esplênica com sonda 12Fr, sendo que sua ponta era avançada até o tronco da veia porta. O reparo da artéria mesentérica superior era feito, cranial à veia renal esquerda, para oclusão durante a infusão da solução de preservação, de modo a evitar desperdício desta solução.

Posteriormente, dissecávamos a aorta para cateterização com sonda 14 Fr. Neste momento, administramos 100 mg/kg de heparina sódica.

A aorta era ligada imediatamente cranial à birurcação das ilíacas. Em seguida através da sonda 14 Fr, tinha início a coleta de 300mL de sangue em bolsa com anticoagulante (BAXTER ACD/CPD). Logo após essa coleta, rapidamente fazíamos a abertura do diafragma e oclusão da aorta torácica com clampe vascular. Simultaneamente, a abertura da veia cava superior junto ao átrio direito permitia a drenagem de sangue e solução de preservação infundida. Dessa forma se iniciava a infusão de solução de preservação no enxerto.

A solução utilizada foi a Euro Collins (Glicose 3,57% - Farmácia do Hospital das Clínicas FMUSP) devido ao seu menor custo e maior facilidade de manipulação. Durante a perfusão, a cavidade abdominal era preenchida com soro fisiológico congelado e triturado. Eram administrados 4 litros de solução de preservação (2 litros na veia porta, 1 litro na aorta e 1 litro na bandeja) a 4° C.

Após a eutanásia por exsanguinação o animal era desconectado do aparelho de ventilação e iniciávamos a retirada do enxerto hepático. A veia porta era seccionada em sua porção proximal, junto à veia esplênica, a veia cava infra-hepática junto à veia renal direita, a veia cava supra-hepática junto com parte do diafragma, o colédoco junto ao pâncreas e o enxerto hepático retirado com a artéria hepática até o tronco celíaco.

Figura 1 Cirurgia do doador



3.2.3 Cirurgia na Bandeja

Durante o procedimento da bandeja e até a lavagem, o enxerto era mantido em um recipiente forrado com saco plástico preenchido com solução de preservação e resfriado por cubos de gelo. Nessa etapa, os elementos vasculares eram dissecados e os ramos dos vasos do hilo hepático ligados. O ducto colédoco era ligado.

3.2.4 Cirurgia do Receptor

O animal receptor era anestesiado e monitorizado da mesma forma que o doador. Realizamos incisão subcostal bilateral com extensão mediana cranial até o xifoide.

Ao contrário do doador, a dissecação dos elementos de fixação e vasculares do fígado do receptor era realizada o mais próximo possível do órgão, para manter pedículos mais extensos para as anastomoses. A via biliar era seccionada e lavada no início da dissecação do ligamento hepatoduodenal. Nos animais do grupo ART, dissecamos e preparamos também a artéria e veia esplênicas do receptor, para sua cateterização com

um cateter triplo. Uma das vias do cateter era introduzida alguns centímetros na artéria esplênica. Outra via foi usada para a canulação da veia esplênica. Essa via tinha sua ponta posicionada no início da veia porta. A terceira via era conectada ao transdutor de pressão do monitor. O esquema de instalação do cateter triplo é mostrado na Figura 4.

O enxerto era lavado com 1L de soro fisiológico, em temperatura ambiente, imediatamente antes do implante no receptor e, em seguida, implantado em posição ortotópica com as anastomoses vasculares realizadas da seguinte maneira:

1 Anastomose da veia cava inferior supra-hepática do receptor com a veia cava inferior supra-hepática do enxerto, com sutura contínua termino-terminal de prolene 4.0

2 Anastomose da veia porta do receptor com a veia porta do doador, com sutura contínua termino-terminal de prolene 6.0

3 *Clampeamento* da veia cava inferior infra-hepática e liberação dos *clamps* da veia porta e veia cava supra-hepática com intuito de diminuir o tempo de isquemia fria, pouco tolerado pelos animais

4 Anastomose da veia cava inferior infra-hepática do receptor com a veia cava inferior infra-hepática do enxerto, com sutura contínua termino-terminal de prolene 5.0

5 Anastomose termino-terminal da artéria hepática comum com sua homônima no receptor com sutura contínua de prolene 7-0

Figura 2 Cirurgia do receptor

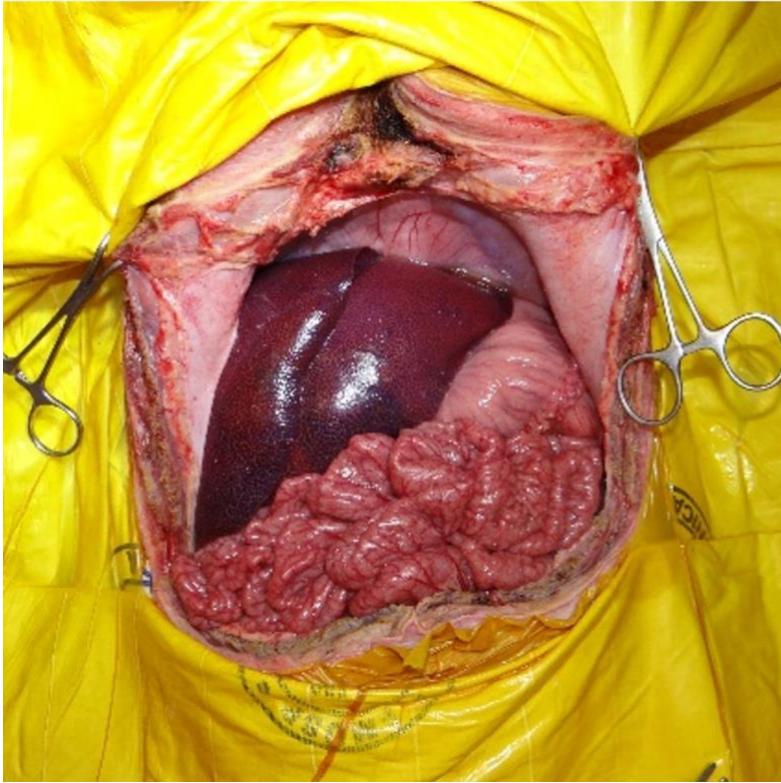
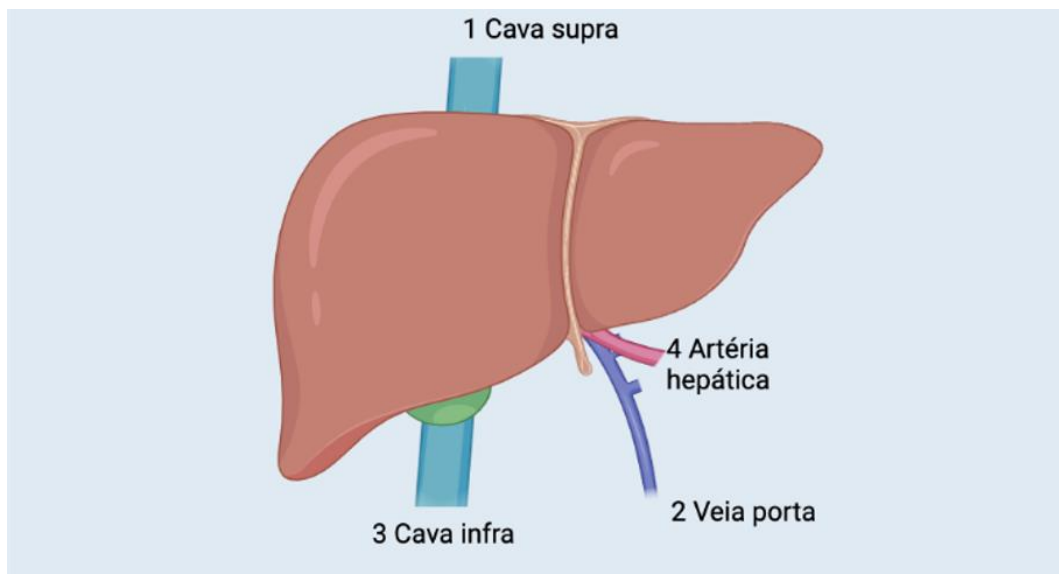
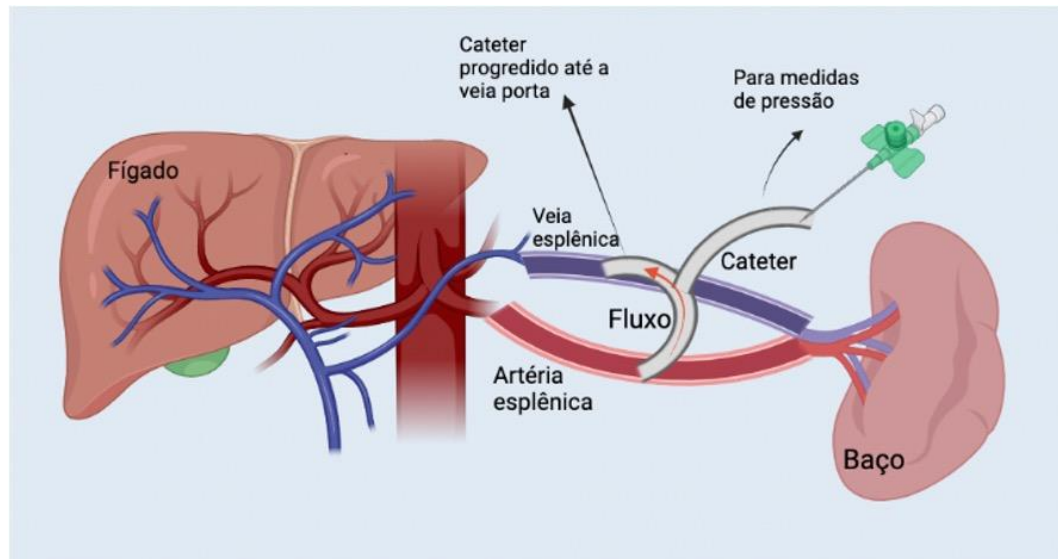


Figura 3 Ordem das anastomoses



No momento da reperfusão, nos animais do grupo ART, o cateter de arterialização da veia porta era aberto, permitindo o influxo de sangue arterial e aumento de pressão no sistema porta.

Figura 4 Representação esquemática do cateter de arterialização



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

O uso de drogas vasoativas foi empregado com parcimônia, em alguns momentos nas cirurgias, para impedir piora irreversível da condição hemodinâmica. No entanto, foram descartados do grupo amostral os animais que apresentaram grande instabilidade hemodinâmica, a ponto de comprometer a coleta de dados ou a conclusão de um transplante minimamente aceitável.

Após um período de 1h, para estabilização do animal, tinha início a fase de coleta e aferições. Retirávamos amostras de fígado, acondicionadas em RNA^{later}® (ThermoFisher Scientific inc.), congeladas e posteriormente processadas pela técnica de RT-PCR para análise de expressão gênica. Outra parte das amostras era acondicionada em formol, para ser processada pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e submetida a análise histológica.

3.3 Métodos de Análise

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

3.3.1 Análise dos procedimentos e animais

Utilizamos uma tabela de campo onde foram anotados os dados relacionados ao experimento: número do experimento, grupo do experimento, peso do doador, peso do receptor, peso do enxerto hepático, horário do início da perfusão do enxerto, horário do clampeamento do receptor e reperfusão do enxerto além de dados gasométricos, fluxométricos e pressóricos utilizados nas análises. Esses dados foram submetidos a comparação entre os grupos ART e CTRL.

3.3.2 Análise Hemodinâmica

As medidas hemodinâmicas foram coletadas nos seguintes momentos: logo após a dissecação das estruturas vasculares no doador (basal do doador); logo após a dissecação das estruturas vasculares do receptor (basal do receptor); uma hora após a reperfusão; três horas após a reperfusão.

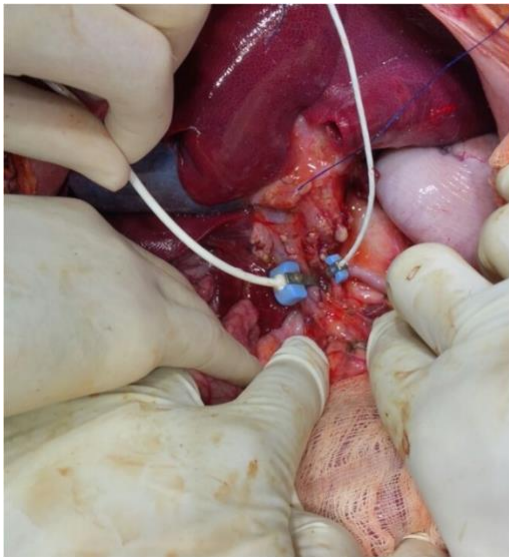
Nesses momentos, foram aferidos: pressão arterial média (PAM); pressão venosa central (PVC); pressão na veia porta (PVP); pressão do sistema (equivalente à pressão de equilíbrio no shunt arteriovenoso); fluxo na veia porta; fluxo na artéria hepática. Com a relação entre os dados de fluxo e a massa do enxerto, obtivemos a medida do fluxo por massa.

As medidas da PAM e da PVC eram obtidas através dos cateteres inseridos na artéria carótida e veia jugular interna direita respectivamente, conectados ao transdutor de pressão do monitor. No animal do grupo controle, a medida da PVP era feita pela punção da veia porta com Jelco número 20 e conexão do Jelco ao transdutor de pressão do monitor. Nos animais do grupo ART, as pressões do sistema (após abertura do shunt)

e da veia porta isoladamente eram medidas por meio do cateter triplo, cujas vias podiam ser fechadas para medidas isoladas de cada vaso, ou abertas, configurando então a pressão de equilíbrio no shunt.

Os fluxos arterial e portal foram medidos com um fluxômetro, cujos transdutores eram acoplados à artéria hepática e veia porta respectivamente. (Figura 5)

Figura 5 Medida do fluxo. À esquerda, transdutores acoplados à veia porta e artéria hepática. À esquerda o fluxômetro.



3.3.3 Análise Histológica

Em 3 momentos do transplante foram coletados fragmentos hepáticos para análise histológica: durante a dissecação do fígado, ainda no doador; uma hora após a reperfusão; e três horas após a reperfusão.

O material proveniente das biópsias hepáticas foi fixado em formalina neutra tamponada a 10%, e em seguida imerso em parafina. Foram preparados cortes histológicos com espessura de 4 μm , corados com hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico, levando-se em conta os seguintes quesitos: grau do infiltrado inflamatório portal e parenquimatoso, caracterizado pela concentração de neutrófilos no campo visual com aumento de 40x (inflamação); a presença de necrose, que era caracterizada pelo achado de corpos apoptóticos e perda da estrutura arquitetural do parênquima hepático. Necrose e apoptose são processos que frequentemente ocorrem simultaneamente no tecido hepático(31), podendo estar

ausente, acometer parcial ou totalmente o lóbulo (necrose); a intensidade de esteatose macro e microgoticular, quantificada pela concentração de gotículas encontradas no campo visual (esteatose); e o edema tecidual e sinusoidal, caracterizado pelo aumento de volume da célula, distorcendo a arquitetura habitual do lóbulo e podendo acomete-lo por completo ou parcialmente (edema). Tais características foram avaliadas de modo semiquantitativo, por meio de pontuações de 0 a 3:

Ausência do achado -0

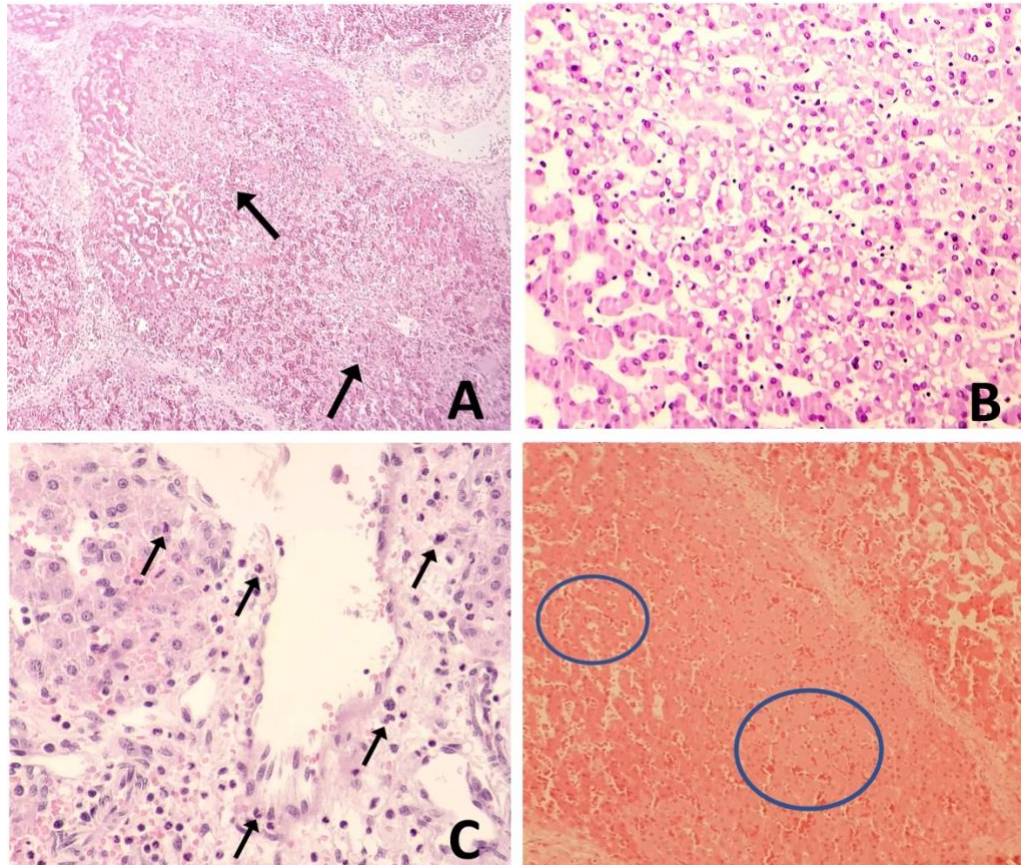
Alteração leve - 1

Alteração moderada - 2

Alteração intensa - 3

Usamos uma variável qualitativa ordinal a partir da soma dos valores de cada experimento em cada variável (inflamação, necrose, esteatose e edema) denominada de índice de isquemia e reperfusão (IIR)(21, 32). A Figura 6 ilustra os principais achados histológicos.

Figura 6 Alterações histológicas. A: Necrose. As setas apontam o desarranjo da arquitetura do parênquima (Aumento de 10x); B: Esteatose. É possível observar as gotículas de acúmulo de lipídios (Aumento de 20x); C: Inflamação: as setas apontam os neutrófilos (Aumento de 40x e zoom da câmera); D: Edema. Os círculos mostram a diferença entre a porção do tecido normal (esquerda) e tecido com edema celular (direita). (Aumento de 20x).



3.3.4 Análise Bioquímica

Para análise bioquímica foram consideradas 4 variáveis: ALT; AST; pH; Lactato. Essas variáveis são consideradas representativas da lesão que se desenvolve no enxerto ao longo do experimento. A coleta dessas variáveis foi realizada nos seguintes momentos: início da cirurgia no doador; após a dissecação das estruturas vasculares do doador; início da cirurgia do receptor; após a dissecação das estruturas vasculares do receptor; no momento da reperfusão; uma hora após a reperfusão; três horas após a reperfusão.

3.3.5 Análise Molecular

A outra parte do material coletado nas biópsias foi preparado para a análise de expressão gênica.

Um fragmento de cada uma das biópsias do enxerto foi avaliado nos seguintes momentos: basal (no doador), imediatamente após a reperfusão, uma hora e três horas após a reperfusão. Usamos a técnica RT-PCR quantitativo em tempo real para estudar os seguintes genes: BAX e cFOS (pró-apoptóticos)(33, 34); Bcl-XL e cJUN (anti-apoptóticos); eNOS (relacionado aos efeitos do óxido nítrico); IL-6 (relacionado à regeneração e proteção contra lesão de isquemia e reperfusão)(35); TNF e ICAM (relacionados a reações inflamatórias)(36). Esses mesmos genes foram avaliados em publicações anteriores do nosso laboratório.(27, 29)

3.3.5.1 Extração de ARN

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

A solução assim obtida foi incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente para completa dissociação de nucleoproteínas, e em seguida adicionamos 200 µL de clorofórmio. Centrifugamos essa solução na velocidade de 10.000 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos em temperatura ambiente. Ao término da centrifugação foi obtida a separação da mistura em 3 fases: uma inferior de coloração avermelhada (fenol-clorofórmio), uma interfase (proteínas), e uma superior, incolor e aquosa. Esta última, que contém o ARN, foi transferida para um tubo limpo onde adicionamos álcool isopropílico. A solução permaneceu em repouso durante 15 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, foi submetida a centrifugação na velocidade de 10.000 rpm por 15 minutos. O ARN precipitado no fundo do tubo ao término da centrifugação foi ressuspensão em água

bidestilada tratada com 0,01% de Dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenado a -80°C para posterior avaliação.

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

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

3.3.5.2 Transcrição Reversa

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

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

Este estudo foi realizado através da técnica de RT-PCR quantitativo ou RT-PCR em tempo real. O gene β -actina foi amplificado como controle interno para a transcrição do ARN e como fator de correção da quantidade de cADN sintetizado.

Os *primers* utilizados para amplificação dos genes descritos estão dispostos na Tabela 1. Foram padronizadas as condições de temperatura, concentração de *primers* e a eficiência das reações de amplificação de todos os genes estudados e do gene β -actina. Elaboramos uma curva com diluições seriadas da concentração de cADN para cada um desses genes para assumir a eficiência das reações, de modo a permitir a avaliação da sua expressão.

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

Tabela 1 Primers utilizados para realização do RT-PCR

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

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

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

O protocolo de amplificação constituiu-se das seguintes etapas: as amostras são desnaturadas a 95 °C por 5 minutos. A seguir são realizados 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento a 60 °C (Bax, Bcl-XL, IL-6, β -actina, c-fos, TNF- α , ICAM) e 62 °C (eNOS) por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. O ciclo final foi seguido por 5 minutos de extensão a 72 °C.

A amplificação gênica realizada pela qRT-PCR é analisada utilizando-se a quantificação relativa(37). Esta descreve a expressão gênica de uma amostra em relação à outra, assim, os resultados deste tipo de quantificação representam ordens de grandeza, como por exemplo, valores menores que um são menos expressos e valores maiores que um são mais expressos em relação ao calibrador.

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

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

O cálculo da quantificação relativa é feito pelo método descrito por Livak. Esse método é determinado pela equação:

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

Todas as amplificações são finalizadas com a curva de dissociação “melting”, com a finalidade de verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de oligonucleotídeos iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico, que poderiam fornecer resultados falsos.

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

3.3.6 Análise Estatística

Parte da análise estatística comparou o grupo controle ao grupo em que foi realizada a cirurgia com arterialização através de variáveis hemodinâmicas, bioquímicas, histológicas e moleculares. As variáveis foram comparadas entre os grupos de trabalho, ao longo do tempo pela análise de variância com dois fatores e pelo teste de Wilcoxon-Ranksum. Posteriormente, foi aplicada a análise de Regressão. Essa análise não levou em conta os dois grupos distintos, mas sim a relação entre variáveis entre si, para estudar associações.

Como as medidas de uma mesma variável estão disponíveis em vários instantes de tempo, foi utilizado a ANOVA two way (Análise de Variância para dois fatores), onde um fator representa o tempo e o outro fator o grupo. A ANOVA teve como objetivo testar a hipótese de que a arterialização traz benefício ao enxerto *large-for-size* nos quesitos analisados. E, portanto, estabeleceu uma comparação entre os grupos ao longo do experimento. A comparação feita por esse tipo de análise aponta diferenças nas evoluções de cada indivíduo, ao longo do experimento.

Por sua vez, a análise pelo teste Wilcoxon-Ranksum compara os dados dos grupos experimental e controle em cada um dos momentos da coleta.

Foi elaborada uma análise de Regressão para a comparação entre as variáveis explicativas (parâmetros hemodinâmicos modificáveis) e as de desfecho (parâmetros bioquímicos, histológicos e moleculares). O objetivo dessa análise foi investigar uma possível associação entre as alterações sofridas pelas variáveis explicativas e as alterações supostamente resultantes nas variáveis de desfecho.

Para encontrar associações entre elas, foi utilizado o modelo Gee (Equações de Estimativas Generalizadas), que são técnicas com a finalidade de realizar a regressão longitudinal (por causa do fator tempo).

O nível de significância adotado nos testes foi de 0,05.

O software R versão 3.6.0 (R Core Team 2020) foi utilizado para a realização de todas as análises.

Os gráficos utilizados foram de perfil, para ilustrar as medidas das variáveis ao longo do tempo, nos diferentes grupos.

As medidas foram expressas em termos de média, desvio padrão e quartis.

4 RESULTADOS

Todos os 15 transplantes considerados no grupo amostral foram executados por completo.

O peso médio dos doadores foi de 39,7kg no grupo ART e 38,1kg no grupo CTRL. O peso dos receptores foi em média 19,1kg e 16,6kg, respectivamente. O GBWR médio, ou seja, a razão percentual entre o peso do enxerto e do receptor foi 5,8 (4,05 – 8,57) no grupo ART e 6,5 (4,5 – 7,5) no grupo CTRL, sem diferença estatística entre eles ($p=0,63$), caracterizando assim a condição *large-for-size*. O tempo de isquemia fria foi $232,0\pm 60,0$ minutos para todos os transplantes. (207(+/-16) para o grupo controle e 253(+/-64) para o grupo ART)

As coletas de dados ocorreram em 9 momentos ao longo de cada experimento. Esses momentos são identificados na tabela abaixo e serão apresentados de forma numérica nos gráficos. Nem todos os dados foram coletados em todos os 9 momentos.

Momento da coleta	Doador / receptor	Fase do experimento
1	Doador	Basal
2	Doador	Após dissecação das estruturas vasculares
3	Doador	Próximo à retirada do enxerto
4	Receptor	Basal
5	Receptor	Após dissecação das estruturas vasculares
6	Receptor	Após preparo para explante
7	Receptor	Imediatamente após reperfusão
8	Receptor	1 hora após reperfusão
9	Receptor	3 horas após reperfusão

Tabela 2 Identificação dos momentos de coleta de dados.

4.1 Dados Hemodinâmicos

A seguir, são exibidos os gráficos que representam os dados hemodinâmicos referentes a fluxo e pressão, mensurados ao longo do experimento. No eixo das ordenadas estão os valores do fluxo em mL por minuto e no eixo das abscissas os instantes de tempos representados numericamente.

Não encontramos diferenças na comparação entre os grupos ART e CTRL, pela ANOVA, com relação aos fluxos na veia porta, na artéria hepática e na razão de fluxo por massa hepática ($p = 0,623$; $p = 0,713$; e $p = 0,615$, respectivamente). Na avaliação momento a momento, também não notamos diferença estatisticamente significativa nos fluxos entre os grupos, nos momentos uma hora e três horas após reperusão com abertura do shunt.

As medidas de pressão ao longo do experimento estão apresentadas na Figura 7 e as medidas de fluxo, na Figura 8. Foram observadas maior pressão no sistema porta no grupo ART, após a abertura do shunt, em comparação ao grupo CTRL ($p = 0.0087$). Em relação às pressões medidas na veia porta isoladamente, pressão arterial média e pressão venosa central, não foram observadas diferenças significativas na comparação entre os grupos ($p = 0,398$; $p = 0,409$ e $p = 0,192$, respectivamente). As medidas feitas momento a momento estão apresentadas nas Figuras 9 a 13.

Figura 7 Dados de pressão nos instantes 2, 5, 8 e 9.

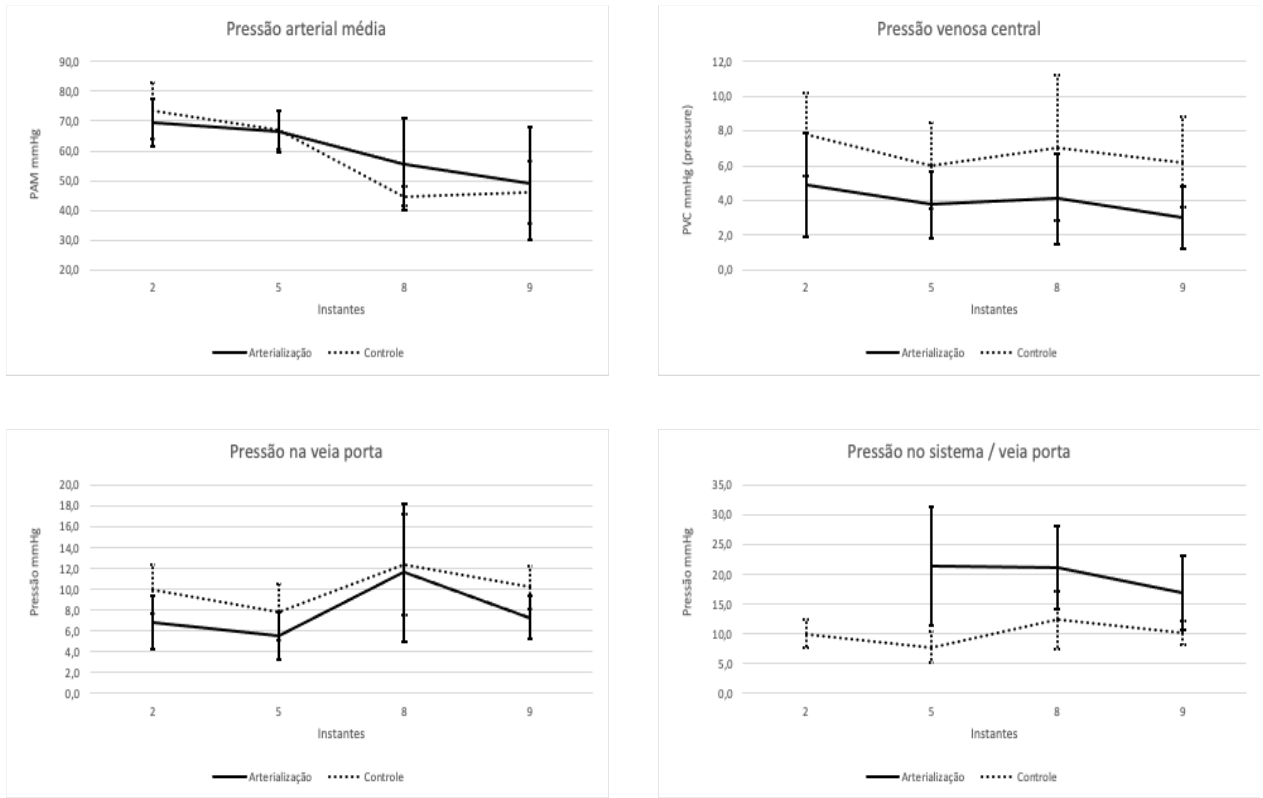


Figura 8 Dados de fluxo nos instantes 2, 5, 8 e 9.

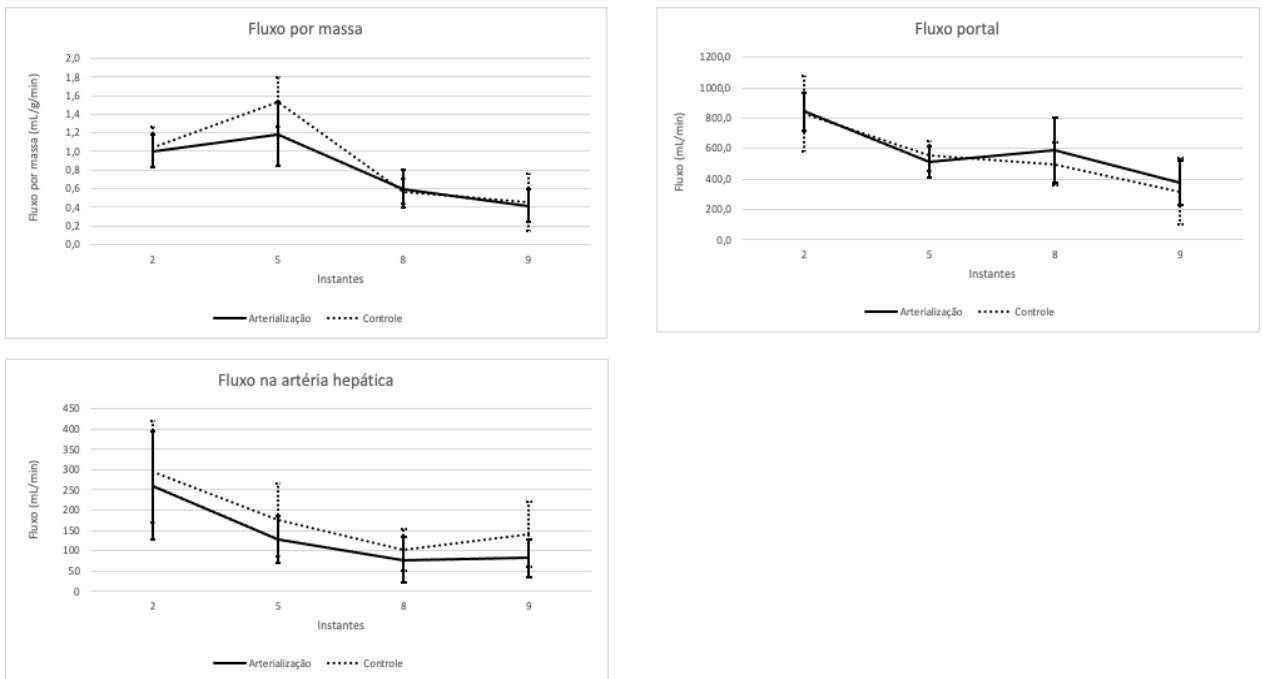


Figura 9 Fluxo portal 1 hora e 3 horas após reperfusão / arterialização.

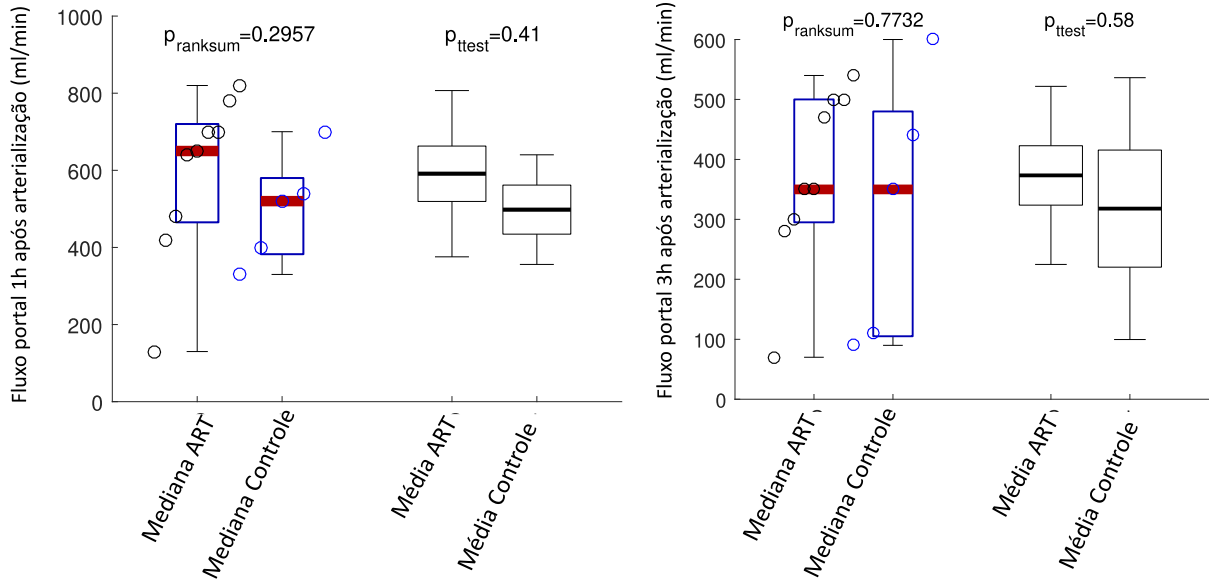


Figura 10 Fluxo na artéria hepática 1 hora e 3 horas após reperfusão / arterialização.

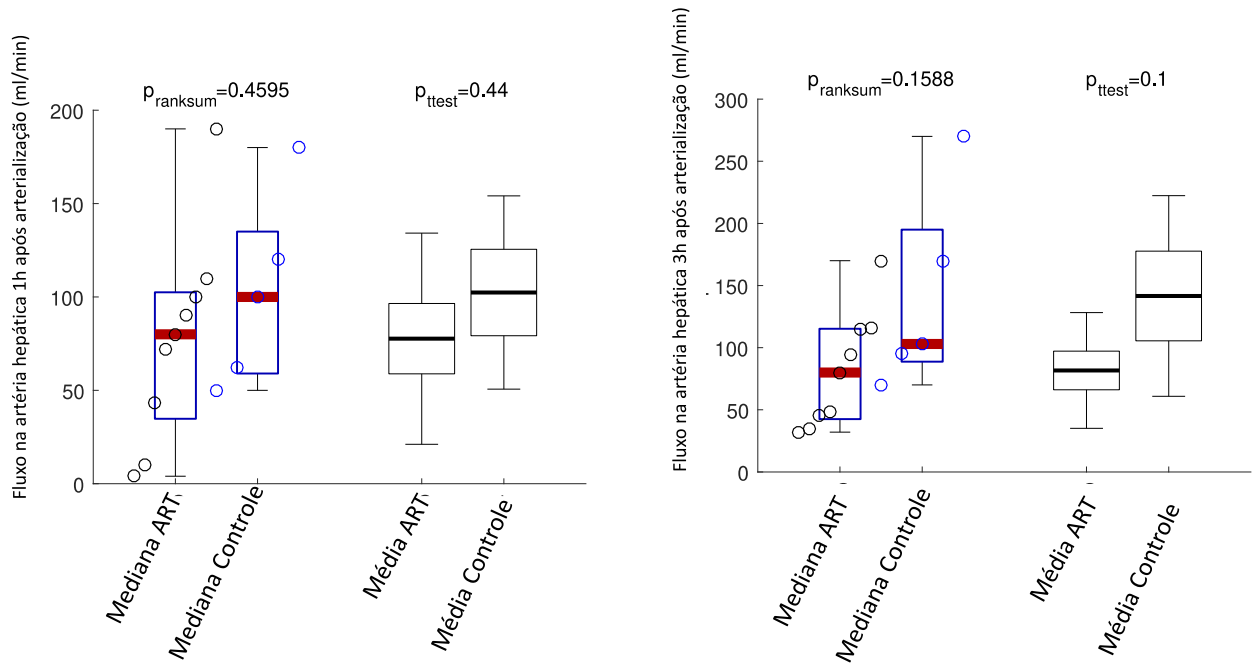


Figura 11 Fluxos por massa 1 e 3 horas após reperfusão / arterialização.

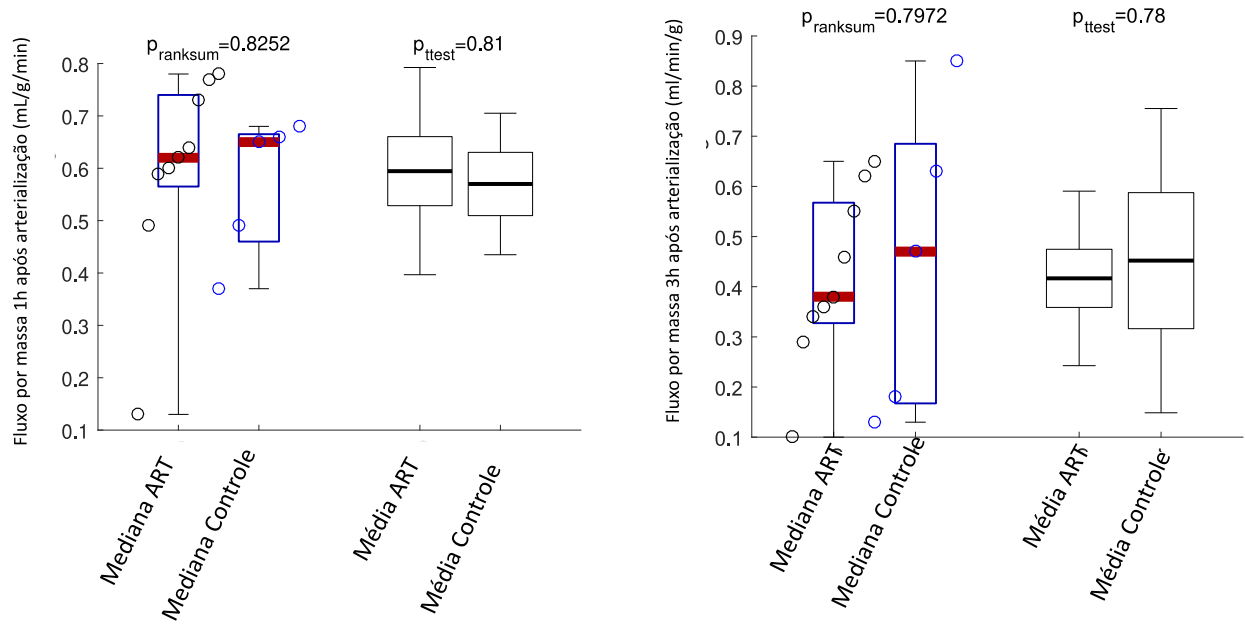


Figura 12 Pressão medida na veia porta e no sistema de arterialização 1 hora após a reperfusão.

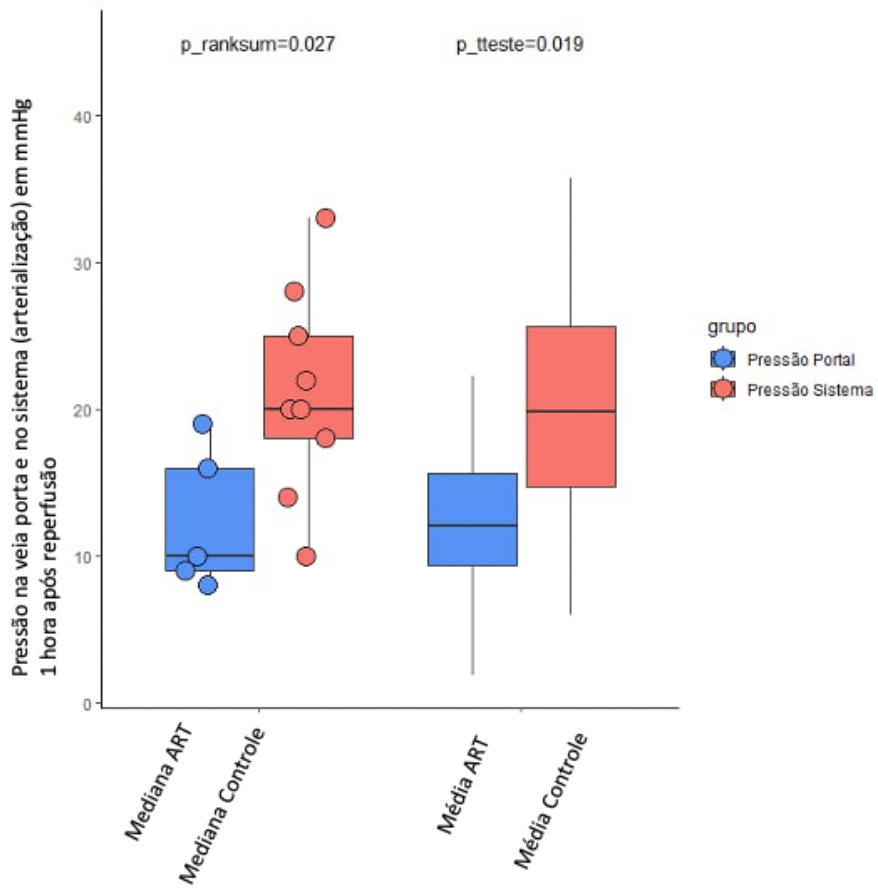
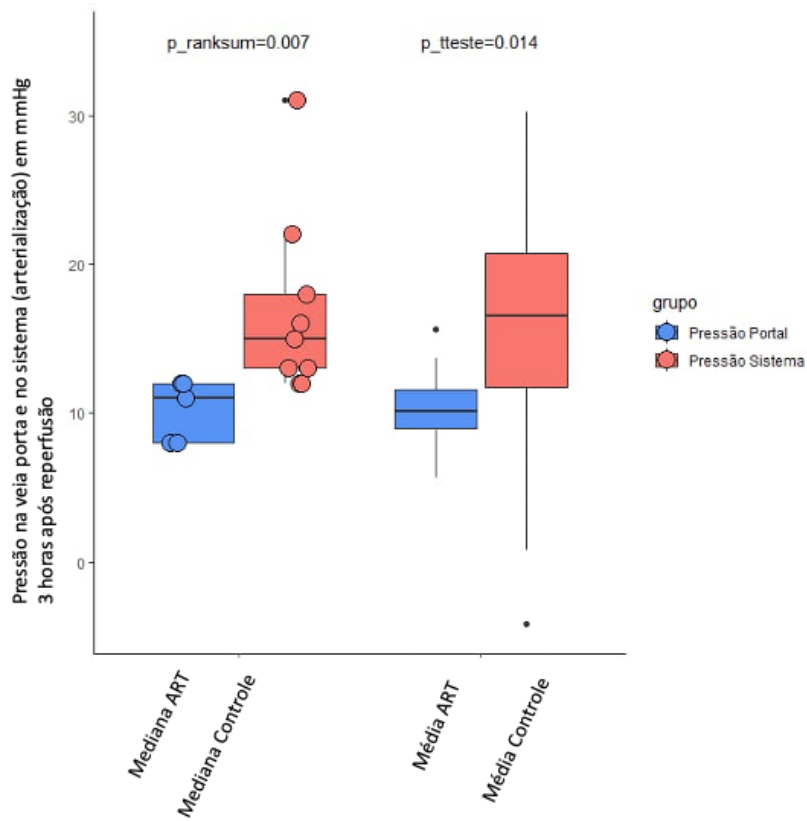


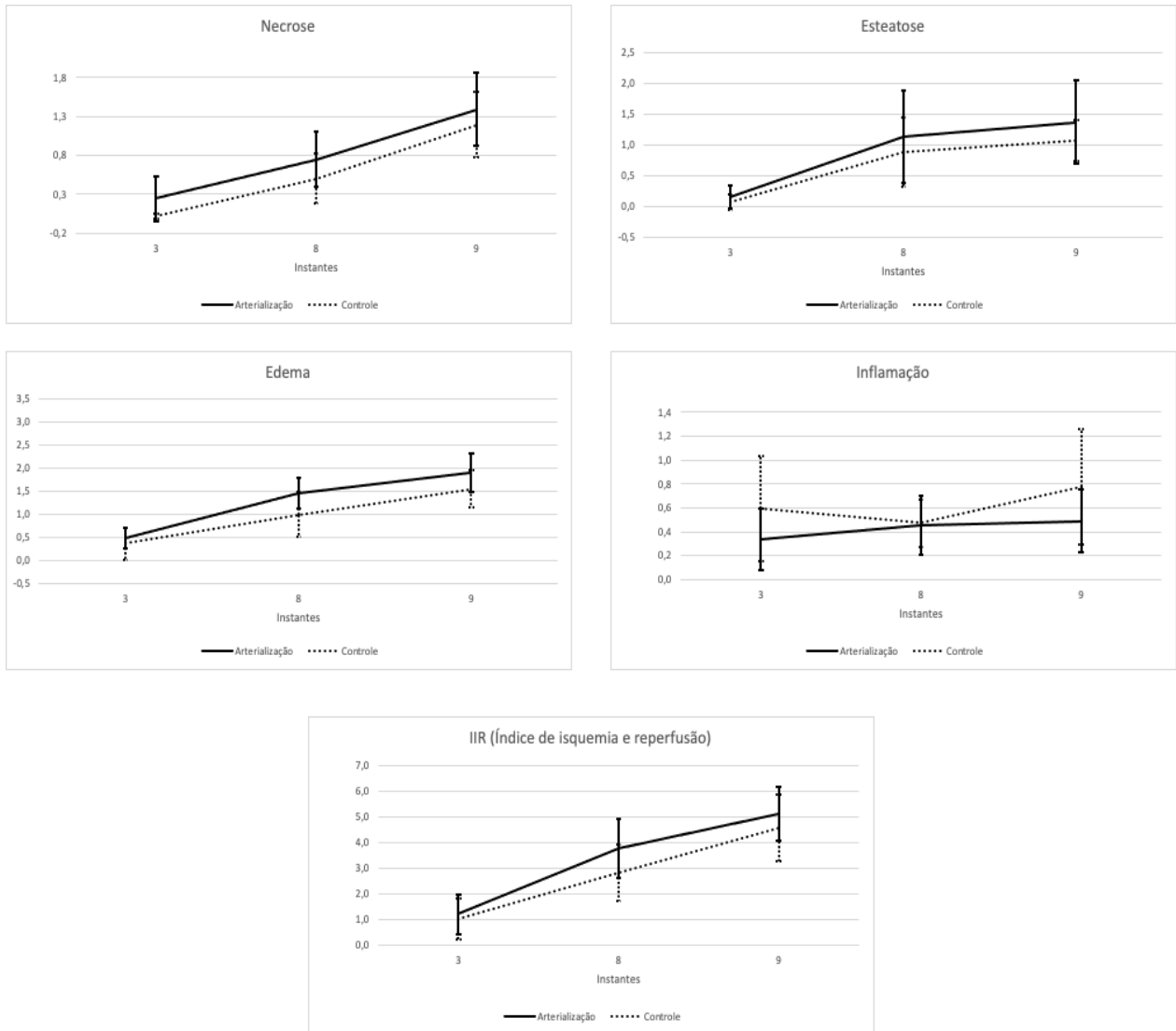
Figura 13 Pressão medida na veia porta e no sistema de arterialização 3 horas após a reperusão.



4.2 Dados Histológicos

Os resultados das comparações entre os dados histológicos, incluindo média e desvio padrão para cada item são apresentados na Figura 14. Não houve diferença estatística entre os grupos ART e CTRL para os parâmetros edema, esteatose, inflamação, necrose e IIR ($p = 1,0$; $p = 0,943$; $p = 0,174$; $p = 0,832$; $p = 0,662$; respectivamente).

Figura 14 Dados histológicos nos instantes 3, 8 e 9.



As figuras a seguir mostram a comparação momento a momento dos dados histológicos. São exibidos os dados obtidos 1 hora e 3 horas após a reperfusão com e sem a arterialização.

Figura 15 Necrose 1 e 3 horas após reperusão / arterialização.

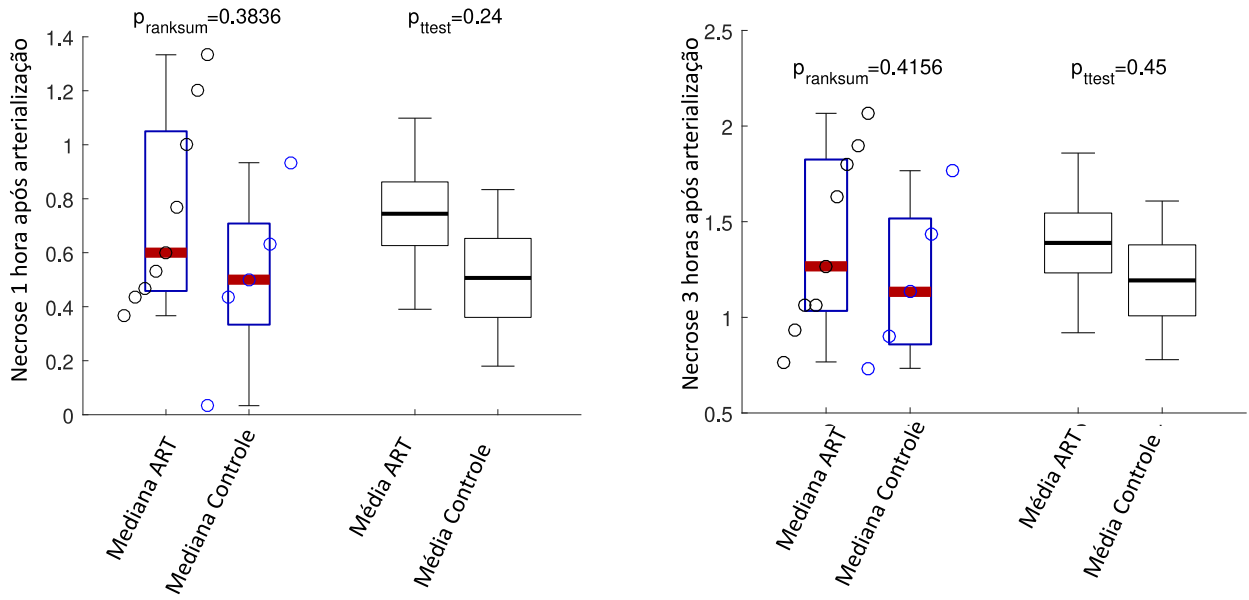


Figura 16 Esteatose 1 e 3 horas após a reperusão / arterialização.

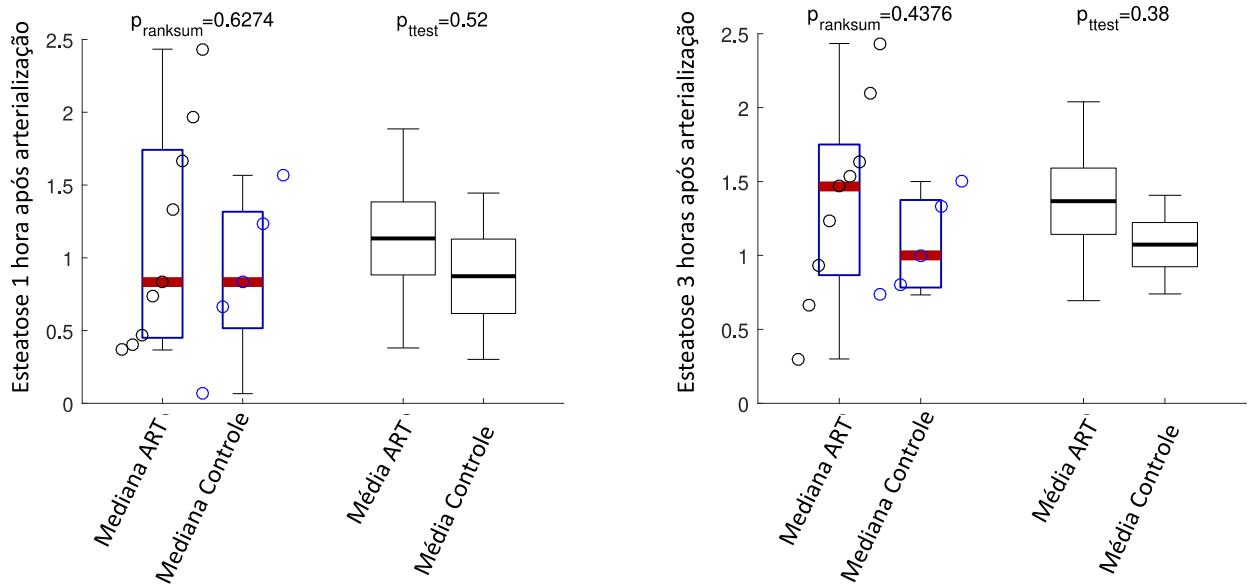


Figura 17 Inflamação 1 e 3 horas após a reperfusão / arterialização.

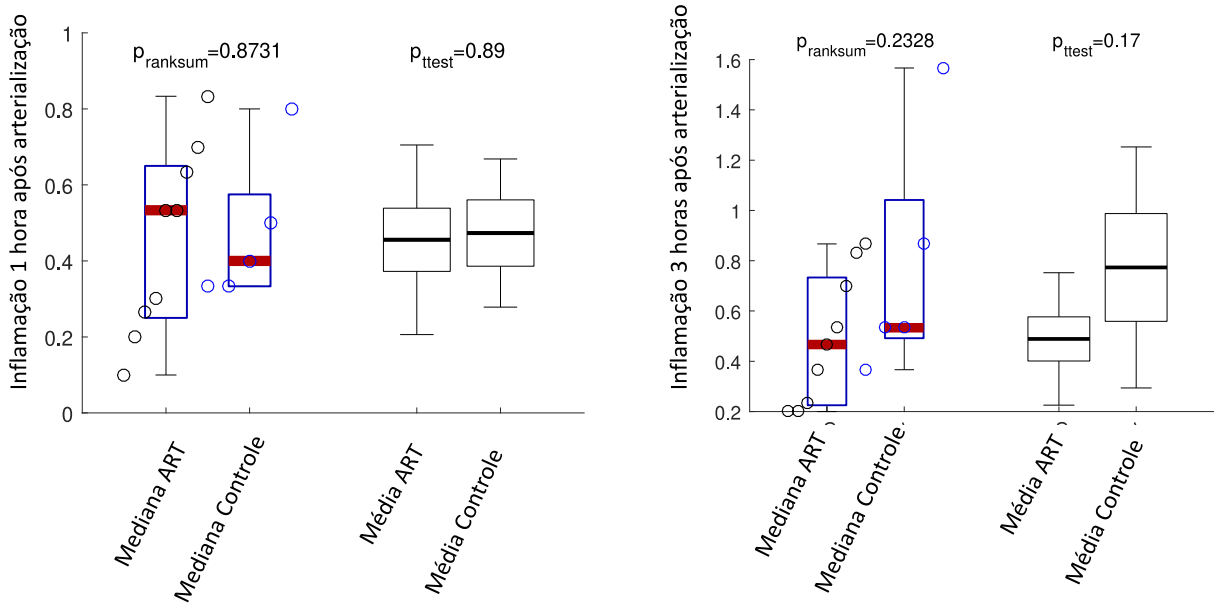


Figura 18 Edema 1 e 3 horas após reperfusão / arterialização.

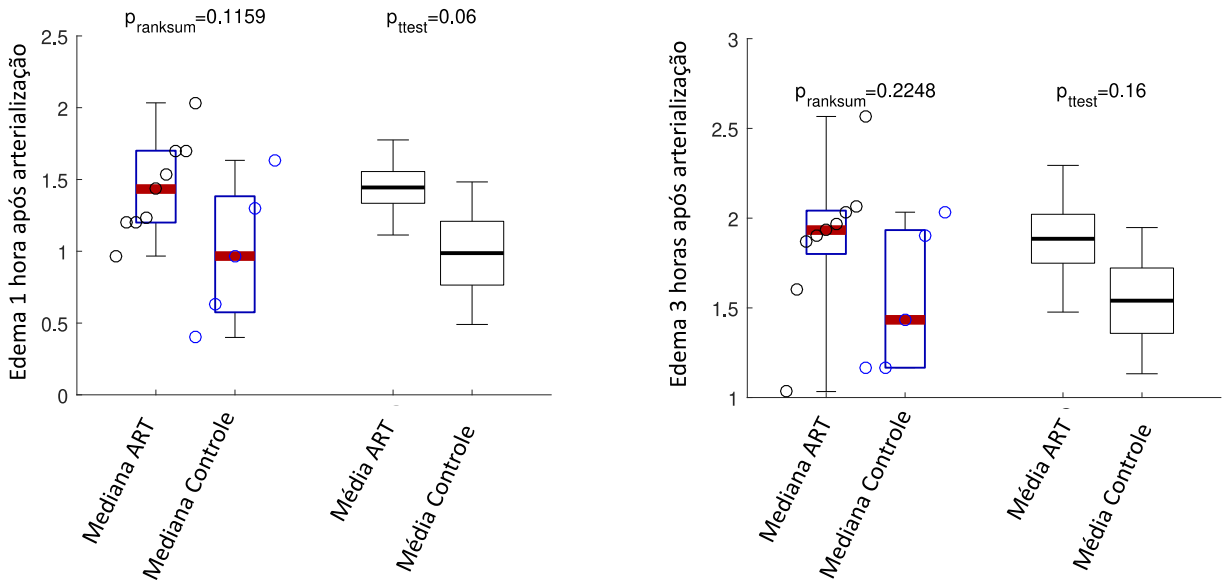
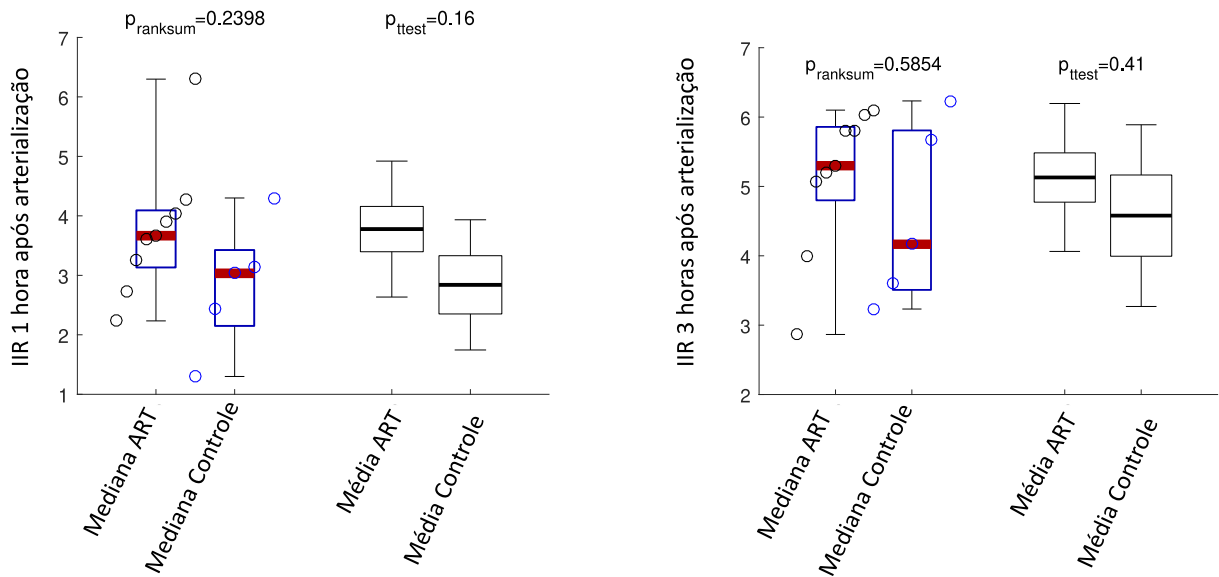


Figura 19 Índice de Isquemia e Reperusão (IIR) 1 e 3 horas após a reperusão / arterialização.



4.3 Dados Bioquímicos

A Figura 20 mostra a comparação entre os dados bioquímicos comparados pela ANOVA. AST e ALT mostraram valores acima do normal durante o experimento em ambos os grupos, com valores menores de ALT no grupo ART ($p = 0,007$) do que no grupo CTRL. Não houve diferença nos valores de AST ($p = 0,204$). Também não houve diferença estatística nos valores de pH e lactato ($p = 0,54$ e $p = 0,699$, respectivamente). A Figura 21 mostra a comparação momento a momento dos valores de ALT. Nesta figura, estão ilustrados os dois últimos momentos da coleta, ou seja, 1 e 3 horas após a reperusão, com e sem arterialização.

Figura 20 Dados bioquímicos. 1-basal do doador; 2-após dissecação dos vasos; 4-basal do receptor; 5-após dissecação dos vasos (receptor); 7-logo após reperfusão; 8-uma hora após reperfusão; 9-três horas após reperfusão.

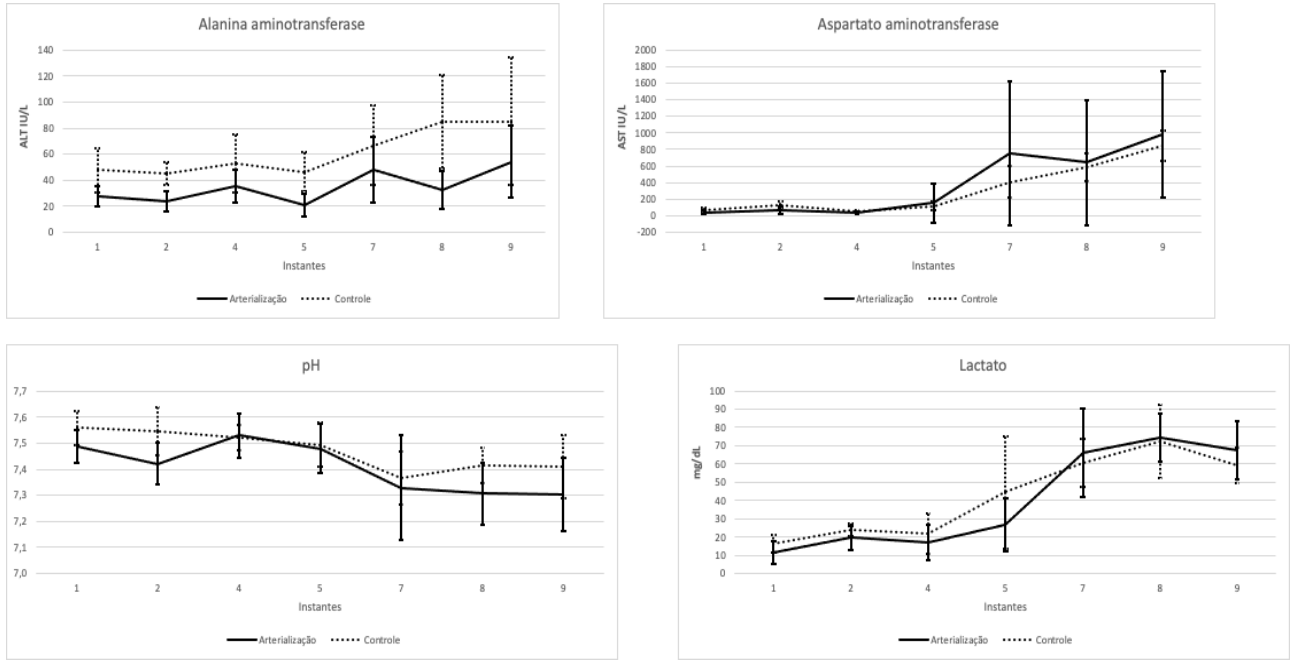


Figura 21 ALT 1 e 3 horas após reperfusão / arterialização.

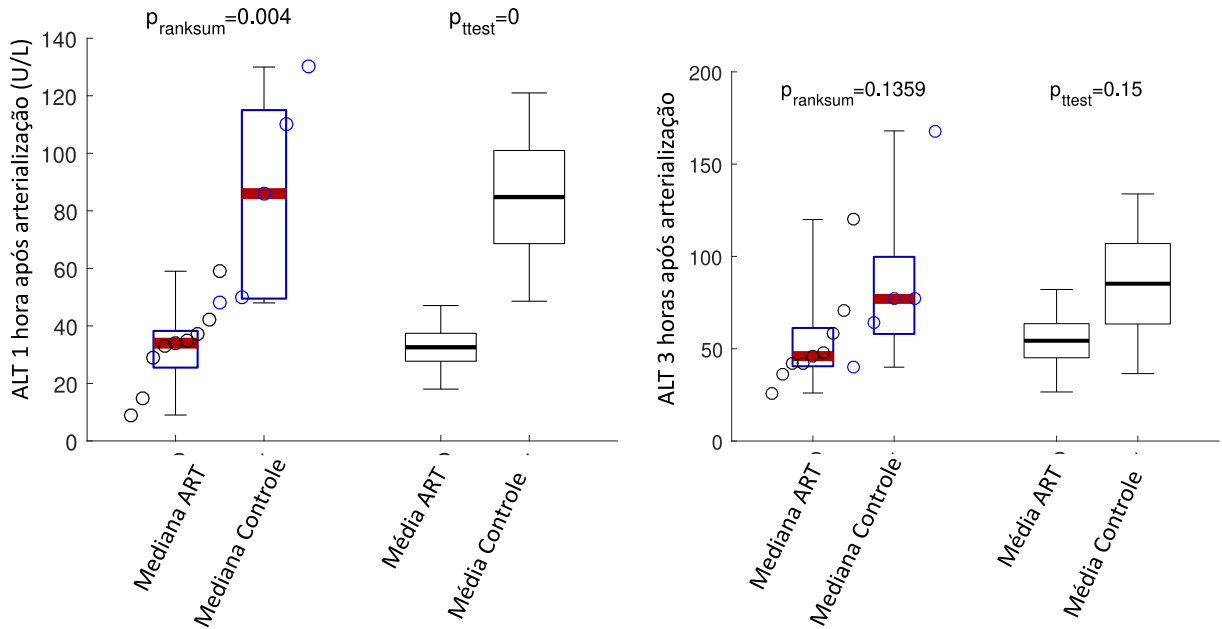
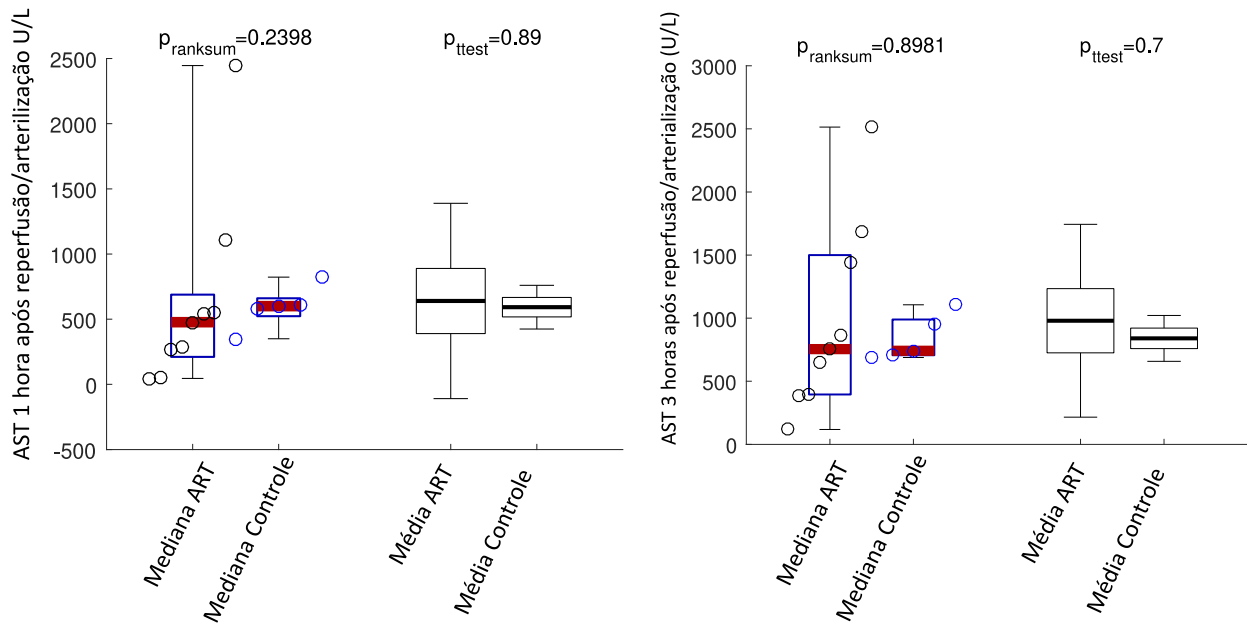


Figura 22 AST 1 e 3 horas após reperusão / arterialização.



4.4 Dados Moleculares

Os dados moleculares são mostrados nas Figuras 23 a 27, com média e desvio padrão. De modo geral, não houve diferença estatística na comparação entre os grupos ART e CTRL ($p = 0,404$ para Bax; $p = 0,123$ para IL6; $p = 0,221$ para Bcl-XL; $p = 0,159$ para ICAM; $p = 0,166$ para eNOS; $p = 0,138$ para TNF; $p = 0,478$ para cFOS; $p = 0,093$ para cJUN).

Na análise momento a momento (teste de Wilcoxon rank-sum), encontramos diferenças significativas na expressão de IL6, 3 horas após a reperusão, mais acentuada no grupo ART ($p = 0,048$), ICAM, imediatamente após a reperusão, mais acentuada no grupo CTRL ($p = 0,03$) e cFOS, 1 hora após a reperusão, mais pronunciada no grupo ART ($p = 0,03$).

Figura 23 Dados moleculares: ICAM, eNOS, IL6 e TNF nos instantes 3, 7, 8 e 9.

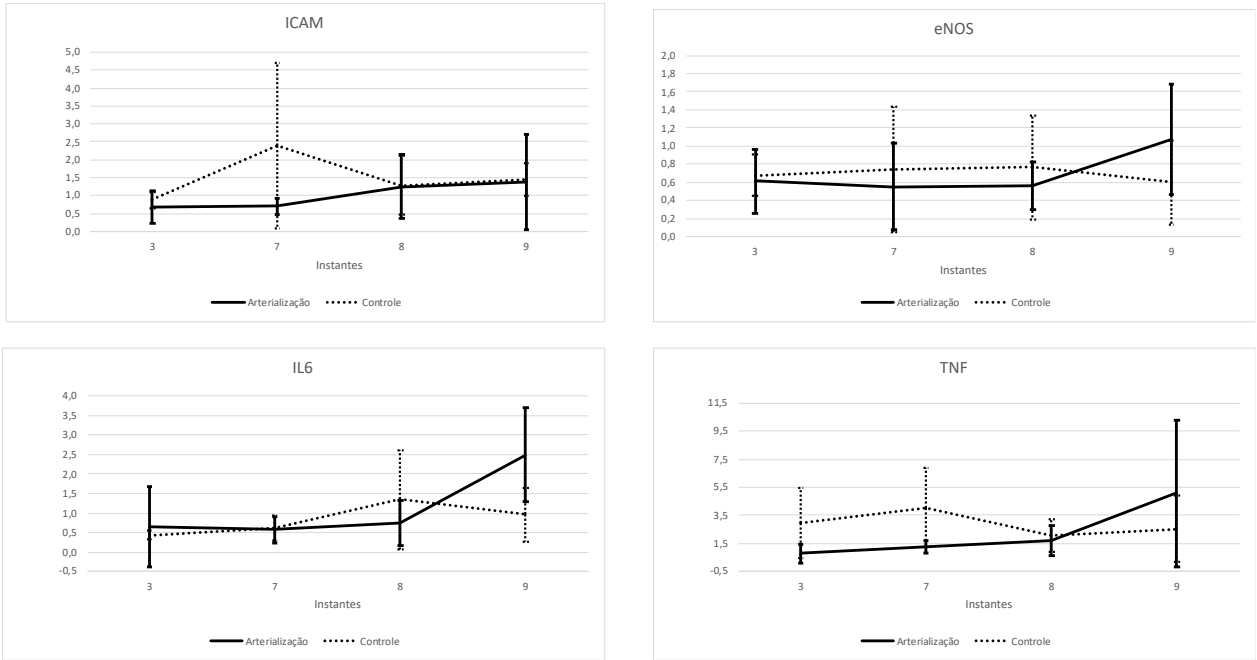


Figura 24 Dados moleculares: BAX, BCL-XL, cFOS e cJUN nos instantes 3, 7, 8 e 9.

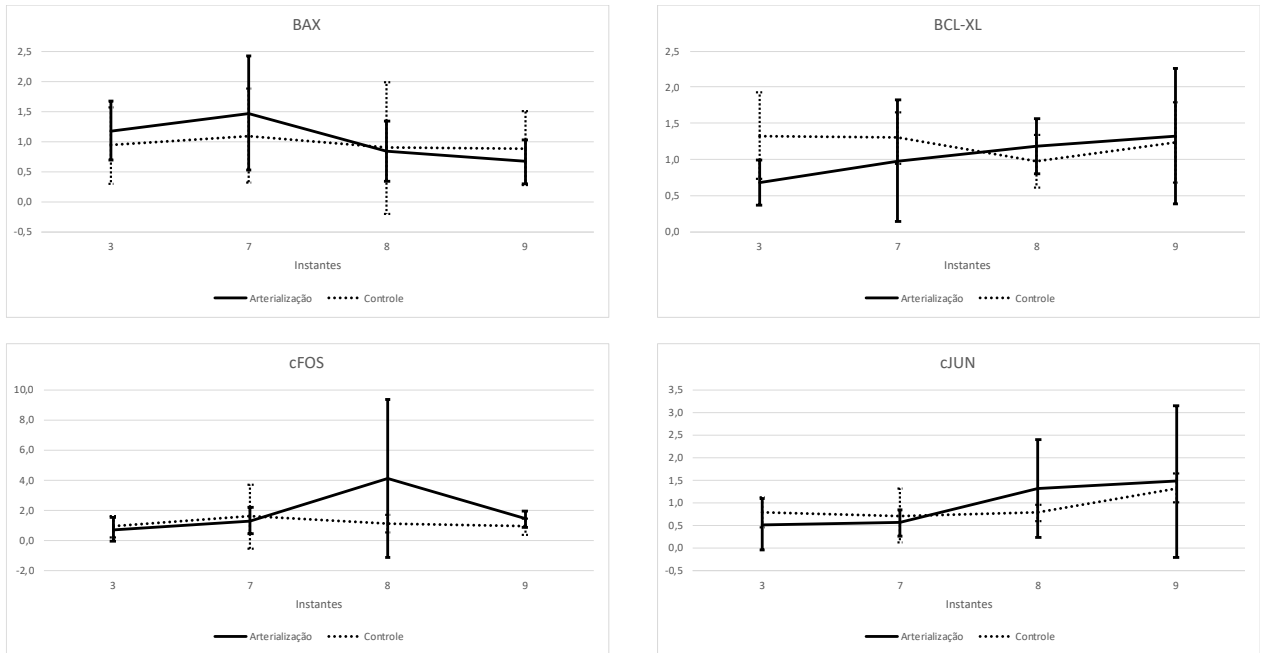


Figura 25 IL-6 1 e 3 horas após reperfusion / arterialização.

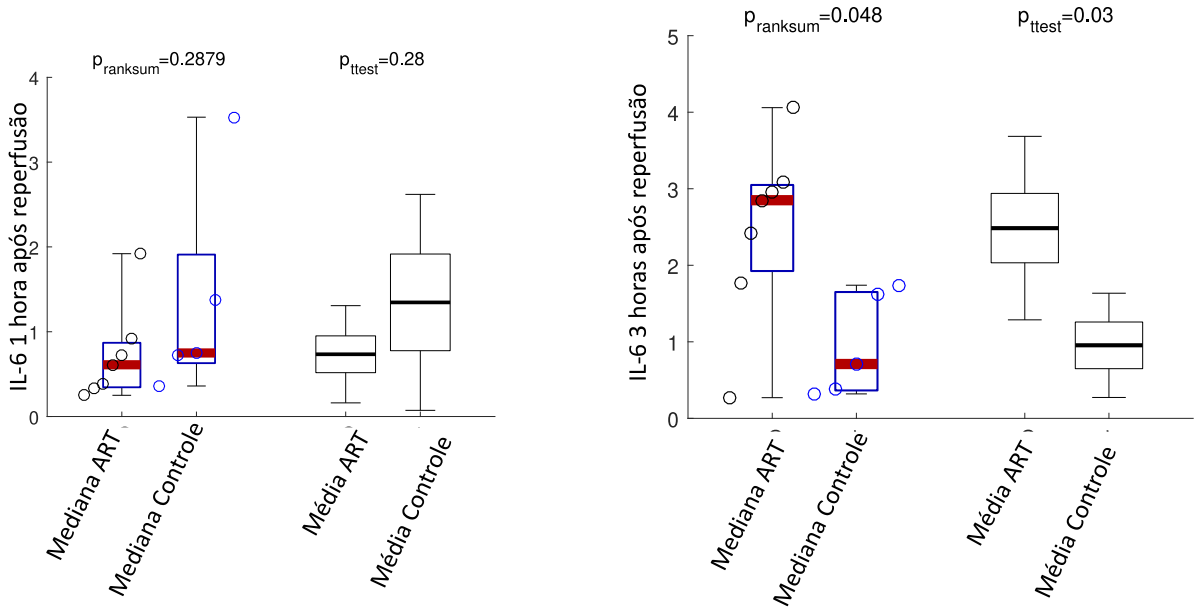


Figura 26 ICAM 1 e 3 horas após reperfusion / arterialização.

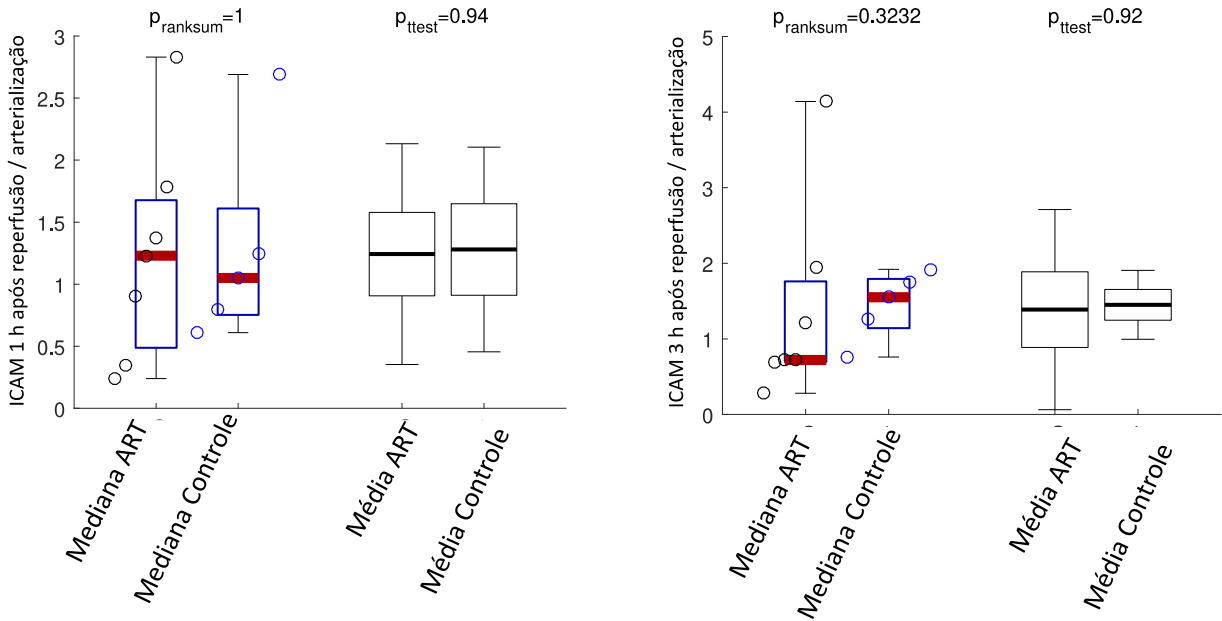
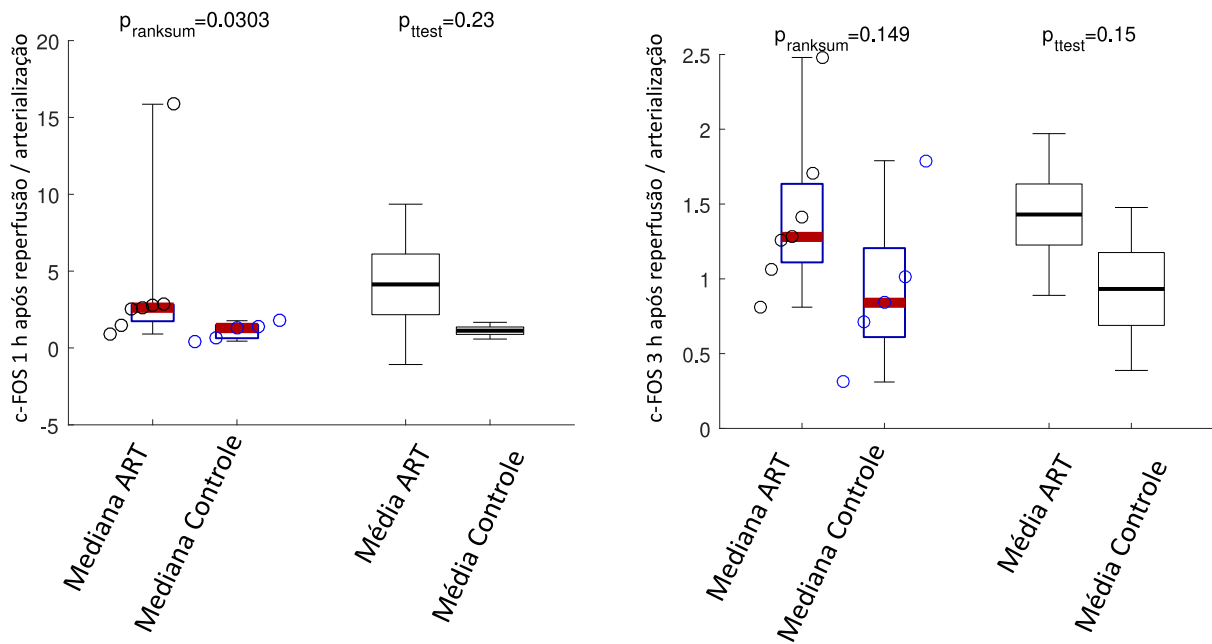


Figura 27 c-FOS 1 e 3 horas após reperfusão / arterialização.



4.5 Análise de Variância (ANOVA)

A seguir é mostrada a Tabela 3 com a análise de variância, sendo a coluna da direita referente ao valor p, que expressa a significância da comparação entre os grupos ART e Controle. Apenas os valores marcados em verde apresentam significância estatística.

Variável	P valor
Fluxo Arteria Hepatica	0,713
Fluxo Portal	0,623
Fluxo massa	0,615
PVP	0,398
PAM	0,409
PVC	0,192
PVP sistema	0,009
ALT	0,007
AST	0,204
Necrose	0,832
Inflamacao	0,174
Esteatose	0,943
Edema	1,000
IIR	0,662
BAX	0,404
BCLXL	0,221
IL6	0,123
ICAM	0,159
eNOS	0,166
TNF	0,138
cFOS	0,478
cJUN	0,093
pH	0,539
Lactato	0,649

Tabela 3 Mostra os valores p das comparações pela ANOVA entre os grupos ART e Controle. Em verde, os valores p com significância estatística.

4.6 Regressão

A análise de regressão testou a associação entre as variáveis explicativas e as variáveis de desfecho. Consideramos como variáveis explicativas aquelas relacionadas a parâmetros hemodinâmicos, potencialmente modificáveis durante o ato cirúrgico. As variáveis de desfecho são aquelas que expressam possível agravo tecidual no enxerto especificamente ou no indivíduo de modo sistêmico.

Segue abaixo a Tabela 4, que mostra o mapa da análise de regressão, explicitando quais os valores em que houve correlação estatisticamente significativa entre as variáveis explicativas e de desfecho.

		Variáveis Explicativas							
		Fluxo Arteria Hepatica	Fluxo Portal	Fluxo massa	PAM	PVC	PVP	PVP sistema	TIF Total
Variáveis Desfecho	ALT								
	AST								
	Necrose								
	Inflamacao								
	Esteatose								
	Edema								
	IIR								
	BAX								
	BCLXL								
	IL6								
	ICAM								
	eNOS								
	TNF								
	cFOS								
cJUN									


 Significativo (p-valor < 0,05)

Tabela 4 Mapa da análise de regressão. Os retângulos verdes representam as variáveis que tiveram associação estatisticamente significativa.

A Tabela 5 abaixo exhibe os resultados da análise de regressão em que houve correlação estatisticamente significativa entre as variáveis de desfecho (primeira coluna) e as variáveis explicativas (segunda coluna). O coeficiente (terceira coluna) pode ser positivo ou negativo. E na última coluna está o valor p.

Variável de desfecho	Variável explicativa	Coefficiente	Valor-p
ALT	Fluxo na artéria hepática	-0,0564	0,0008
ALT	Fluxo portal	-0,0358	0,0020
ALT	Fluxo por massa	-25,5521	0,0005
ALT	PAM	-0,6495	0,0003
ALT	PVC	-3,9643	0,0038
ALT	Pressão do sistema	-1,1154	0,0494
ALT	Tempo total de isquemia	0,0916	0,0379
AST	Fluxo na artéria hepática	-1,2745	0,0023
AST	Fluxo portal	-0,7913	0,0050
AST	Fluxo por massa	-637,9945	0,0001
AST	PAM	-15,3980	0,0176
BAX	Fluxo por massa	0,9404	0,0454
BCLXL	Fluxo na artéria hepática	0,0034	0,0264
BCLXL	PVC	-0,0798	0,0090
Edema	Fluxo portal	-0,0010	0,0226
Edema	PAM	-0,0120	0,0033
Edema	PVP	-0,0423	0,0006
Edema	Pressão do sistema	-0,0288	0,0366
eNOS	Fluxo portal	-0,0007	0,0299
eNOS	PVC	-0,0772	0,0090
ICAM	PVP	-0,0601	0,0046
ICAM	Pressão do sistema	-0,0725	0,0314
IIR	Fluxo portal	-0,0025	0,0384
IIR	PVP	-0,1268	0,0001
IL6	PVP	-0,0928	0,0001
IL6	Pressão do sistema	-0,0922	0,0315
Inflamação	Fluxo na artéria hepática	0,0024	0,0004
Inflamação	PAM	0,0071	0,0256
Inflamação	PVP	-0,0216	0,0362
Necrose	Fluxo portal	-0,0013	0,0082
Necrose	PVP	-0,0402	0,0070
TNF	PAM	-0,0719	0,0297
TNF	PVC	-0,3577	0,0300
Lactato	Fluxo na artéria hepática	-0,1424	0,0001
Lactato	Fluxo portal	-0,0496	0,0001
Lactato	Fluxo por massa	-38,2938	0,0001
Lactato	PAM	-0,8537	0,0001
Lactato	PVP	3,0682	0,0001
Lactato	Pressão do sistema	1,2694	0,0179
pH	Fluxo na artéria hepática	0,0003	0,0054
pH	Fluxo portal	0,0002	0,0108
pH	Fluxo por massa	0,1486	0,0002
pH	PAM	0,0058	0,0001
pH	PVC	0,0133	0,0180
pH	PVP	-0,0093	0,0007

Tabela 5 Análise de regressão, mostrando os valores dos coeficientes de regressão (positivo ou negativo) e o valor p.

5 DISCUSSÃO

A maior motivação deste trabalho foi uma situação adversa vivenciada com frequência por equipes que lidam com o transplante hepático pediátrico, a perfusão pouco satisfatória do enxerto no momento da abertura dos clampes vasculares. A evolução da técnica e a grande demanda levam à realização de transplantes em pacientes cada vez menores. Entretanto, os enxertos disponíveis são quase sempre provenientes de adultos, o que implica numa desproporção de tamanho.

A hepatopatia com cirrose e circulação colateral, típicas nos nossos pacientes, contribuem para uma piora do fluxo na veia porta, o que agrava o déficit relativo na perfusão do enxerto(38).

A simples redução do tamanho do enxerto, além de implicar em maior morbidade por aumentar a extensão de lesão do parênquima hepático, muitas vezes não é factível, dadas as características típicas da anatomia vascular hepática.

A arterialização da veia porta, já utilizada em outros contextos e com diferentes técnicas, parece ser um artifício que oferece benefícios nesse contexto.

Se por um lado a arterialização tem o potencial de fornecer maior pressão e oxigênio para o enxerto no momento da reperfusão, sua permanência no longo prazo também pode implicar em lesão ao hepatócito, além de um aumento da pressão portal pré sinusoidal, com a possibilidade de alterações na fisiologia da circulação esplâncnica.

Foi diante dessa problemática que nosso grupo tentou elaborar uma estratégia para aumentar o aporte de sangue no momento da reperfusão do enxerto, com um método de execução relativamente simples e com a possibilidade de ser encerrado de modo também simples.

Desenvolvemos, portanto, uma técnica de arterialização parcial, artificial e potencialmente temporária. Parcial pois o fluxo arterial se soma ao fluxo portal e não o substitui por completo. Artificial pois a técnica foi executada com uso de um cateter e não com anastomose dos vasos em questão, embora a realização da anastomose também seja uma possibilidade a ser testada. E potencialmente temporária pois permite sua interrupção, pela remoção do cateter oportunamente.

A instalação do dispositivo para arterialização foi realizada durante a dissecação do fígado do receptor e levou a um aumento do tempo da cirurgia no grupo ART. Em média, o tempo de isquemia fria foi 46 minutos maior neste grupo. Com o aperfeiçoamento da técnica esse tempo poderia ser reduzido, já que a cateterização dos vasos esplênicos é relativamente pouco complexa. O tempo de isquemia teve associação positiva discreta com a dosagem de ALT, conforme observado pela análise de regressão. Mas não houve associação com outras variáveis.

A técnica de arterialização utilizada neste trabalho provocou aumento expressivo da pressão no sistema porta, em torno de 70% em relação ao controle. Isso fica evidente quando observamos o gráfico de Pressão no sistema / veia porta, apresentado na Figura 7. A curva do grupo ART só inicia após a reperfusão pois foi a partir desse momento que abrimos o shunt com a artéria esplênica, configurando, portanto, a arterialização.

Nas horas seguintes à abertura do shunt, também pudemos observar um edema de alças intestinais discretamente maior no grupo ART, o que certamente é reflexo de uma maior pressão portal, com retorno venoso mais difícil. A média e mediana da frequência cardíaca dos grupos não teve diferença estatística. Porém, pudemos observar que a condição hemodinâmica do animal do grupo ART apresentava maior labilidade após a reperfusão. Isso pode ser observado por variações maiores na pressão arterial, frequência cardíaca e PVC, entre os momentos de coleta, exigindo maior rigor no controle anestésico.

Diferente do que era esperado, o fluxo na veia porta não sofreu elevação significativa após a abertura do shunt. No gráfico do fluxo portal apresentado na Figura 8, a curva que representa o grupo ART expressa valores maiores que o grupo controle, porém essa diferença não teve significância estatística nem pela ANOVA (Tabela 2), que analisa a curva como um todo, nem pela análise momento a momento. Esse achado vai contra a expectativa inicial do nosso grupo e inclusive difere do que sugerem publicações anteriores. Shimizu e colaboradores, em estudo experimental publicado em 2000, demonstraram aumento do fluxo portal após arterialização parcial da veia porta. Entretanto, esse aumento ocorreu apenas 10 dias após a arterialização, que foi realizada no órgão sem suprimento arterial.(13)

A explicação para o achado do estudo atual provavelmente está na grande capacitância do sistema esplâncnico, que redistribui o aumento de pressão tanto para proximal quanto distal. Assim, após o estabelecimento de um equilíbrio, poucas horas depois da reperfusão, o fluxo mensurado na origem da veia porta é praticamente o mesmo.

Nos gráficos da Figura 08, é interessante notar que existe uma tendência de queda do instante 2 ao 5. Isso ocorre porque o instante 2 representa o animal doador que, por ser maior, apresenta maior fluxo venoso e arterial. Uma hora após a reperfusão, nota-se um aumento do fluxo portal no grupo ART, o que não ocorre no controle. Esse aumento foi fugaz e, após 3 horas, o fluxo tende a cair em ambos os grupos, consequência da piora hemodinâmica dos animais neste momento da cirurgia.

Em proporção semelhante, o fluxo arterial se manteve maior nos animais do grupo controle. Muito provavelmente, isso se deve a mecanismos fisiológicos compensatórios e, ainda que também não tenha tido significância estatística, indica uma resposta ao aumento do fluxo portal.(39, 40)

Os demais achados hemodinâmicos também não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo.

Os parâmetros bioquímicos mensurados ao longo do experimento, com aumento do lactato e queda do pH, refletem estresse cirúrgico causado pela dissecação e manipulação de grandes vasos, além de variações na perfusão tecidual. Não houve diferença significativa desses parâmetros na comparação entre os grupos.

Observamos diferença estatisticamente significativa na comparação entre as curvas da ANOVA referentes a ALT dos grupos, mantendo-se maior no grupo controle ao longo de todo o experimento (valor $p=0,007$). Entretanto, considerando os valores habituais desta enzima e os valores de fato observados, pode-se dizer que a diferença encontrada é pouco relevante para que se estabeleçam conclusões. É possível que um grupo amostral maior anulasse essa diferença.

Os achados histológicos também ilustram maior sofrimento do enxerto ao longo do experimento. O surgimento de necrose, esteatose, edema e inflamação foi mais exuberante ao longo das coletas e, conseqüentemente, o índice de isquemia e reperfusão

também teve um valor crescente. Na comparação entre os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais arterializados e os animais do grupo controle. É possível que um tempo maior de observação defina melhor as alterações histológicas e permita a identificação de diferenças entre os grupos.

Em ambos os grupos, a necrose do tecido hepático ocorreu predominantemente de forma mais central no lóbulo, ou seja, mais próximo à veia centrolobular. Esse achado é semelhante ao de outros trabalhos da literatura, que mostram que as áreas mais centrais do lóbulo são as primeiras a manifestar o sofrimento pela lesão de isquemia e reperfusão.(41)

Em relação aos achados moleculares, na análise de variância, não detectamos diferença significativa na comparação entre os grupos do estudo. Porém, ao compararmos as expressões de genes de fase aguda em cada momento do experimento, algumas diferenças de expressão foram observadas. As alterações moleculares representam a reação do tecido em sua forma mais inicial, e permitem a identificação do tipo de resposta apresentada, mesmo antes que se possa notar alterações bioquímicas ou histológicas.

Pelo teste de Wilcoxon rank-sum, encontramos diferenças significativas na expressão de IL6, 3 horas após a reperfusão, mais acentuada no grupo ART ($p = 0,048$). A expressão do gene cFOS, 1 hora após a reperfusão, foi mais pronunciada no grupo ART ($p = 0,03$). A expressão do gene da ICAM imediatamente após a reperfusão foi mais acentuada no grupo CTRL ($p = 0,03$).

Em um experimento com roedores, Camargo e colaboradores demonstraram um papel protetor da Interleucina 6 em relação à lesão de isquemia e reperfusão. Os autores demonstraram que animais sem o gene da IL6 (IL6^{-/-}) apresentaram maior intensidade da lesão de isquemia e reperfusão em comparação aos animais controle e aos animais IL6^{-/-} tratados previamente com IL6 recombinante. Em publicação de 2007, Coelho e colaboradores também ilustram o papel da IL6 na regeneração hepática, em experimento com ratos, demonstrando a maior expressão desta interleucina após a realização de hepatectomia extensa.(42, 43)

Portanto, concluímos que a maior expressão dessa interleucina no grupo ART pode indicar maior ativação de mecanismos de proteção contra a LIR, em relação ao controle.

Já a expressão de ICAM está relacionada a maior lesão hepática associada à isquemia e reperfusão. Em experimento feito com ratos, Farhood e colaboradores demonstraram uma atenuação da lesão de isquemia e reperfusão no fígado após o bloqueio da atuação da ICAM por meio de anticorpos específicos.(44)

Em nosso experimento, detectamos maior expressão de ICAM no grupo controle, logo após a reperfusão. Isso também é um indício, ainda que discreto, de um possível papel protetor da arterialização.

A maior expressão de cFOS ocorre nas fases mais precoces (1 a 3 horas) após a lesão de isquemia e reperfusão. Sendo um gene de expressão imediata pós lesão, foi demonstrada associação de seu transcrito com a regeneração dos hepatócitos. Em experimento realizado em camundongos submetidos a lesão de isquemia e reperfusão hepática, Schlossberg e colaboradores (1996) demonstraram a presença desta molécula nas primeiras horas após a lesão de isquemia e reperfusão, associada à presença do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) no tecido hepático.(41) A maior expressão do RNAm de cFOS no grupo ART, ainda que de forma transitória, sinaliza para um benefício da arterialização.

A análise por regressão estabeleceu associações entre as variáveis explicativas e as variáveis de desfecho. Consideramos variáveis explicativas aquelas relativas aos parâmetros hemodinâmicos. Esses parâmetros são potencialmente modificáveis durante a cirurgia, seja por aperfeiçoamento da técnica cirúrgica, maior velocidade de execução ou mesmo alterações nas configurações das anastomoses vasculares. Seja pela técnica empregada neste experimento ou outras que se possam criar, a redistribuição da perfusão hepática é passível de alteração, bem como a condição hemodinâmica geral do animal.

Um extrato da Tabela 05 ilustra os valores que apresentaram coeficiente de maior módulo e, conseqüentemente, expressam associações mais consistentes:

Lactato x fluxo por massa: -38,3

Bax x fluxo por massa: 0,94

ALT x fluxo por massa: -25,6

AST x fluxo por massa: -638

AST x PAM: -15,4

ALT x PVC: -3,96

De modo geral, conforme é possível extrair da tabela, o fluxo na veia porta apresentou associação aparentemente benéfica com todos os parâmetros bioquímicos e histológicos. Essa associação, embora discreta em nosso experimento, vai de encontro aos achados de outros trabalhos da literatura que apontam a intensidade do fluxo portal como um importante parâmetro hemodinâmico no desfecho do transplante ou na viabilidade do órgão. Normalmente, o fígado recebe em torno de 1,3ml/min/g de sangue e é importante que esse fluxo seja mantido. Claramente, no transplante *large for size* ocorre redução desse valor no momento do implante (Figura 08), o que agrava a LIR.

Maior fluxo por massa se associou a menores valores de lactato, AST e ALT, além de melhora do pH (embora neste último caso a associação tenha sido menos expressiva). Esses achados não surpreendem e ilustram que a perfusão mais adequada leva a menos lesão celular e sofrimento tecidual. Da mesma forma, a manutenção de níveis pressóricos e PVC altos indicam melhor condição hemodinâmica, o que também implica em melhor perfusão tecidual de modo geral.

A expressão do gene BAX está relacionada a maior ocorrência de apoptose. Em experimento realizado em camundongos transgênicos, Ziv Bem-Ari e colaboradores (2007) demonstraram menor lesão celular e menor ocorrência de necrose e esteatose, pós LIR, em camundongos BAX-/-.(45) O achado de um coeficiente de regressão positivo entre o fluxo por massa e a expressão do gene BAX, quando analisado de forma isolada, sugere a maior ocorrência de apoptose quanto maior o fluxo por massa. Porém a interpretação do achado isoladamente pode ser equivocada.

A modulação da perfusão hepática já foi assunto de diversos estudos e parece ser um recurso útil em alguns contextos. A possibilidade de controlar o fluxo no momento da reperfusão do transplante hepático já apresentou benefícios no enxerto *small for*

size(46, 47) e parece ter utilidade também no *large for size*. Através de nosso experimento, buscamos investigar as possíveis vantagens ou desvantagens de uma arterialização. Nosso trabalho teve como uma das principais características a reprodução do contexto real de um transplante hepático, não apenas pela escolha de um animal com características anatômicas semelhantes ao ser humano, mas também pela aplicação da proposta de arterialização durante um transplante real e com todas as dificuldades inerentes a essa cirurgia.

Essas características são também responsáveis pelas limitações do nosso trabalho. A busca pela reprodução de um contexto real de transplante traz a dependência de pessoal qualificado, grande disponibilidade de tempo e de recursos materiais. A variabilidade natural existente entre os animais no tocante a peso, presença de eventuais patologias subjacentes, além de variabilidade na resposta fisiológica trazem vieses que também existem quando lidamos com seres humanos. Entretanto, no contexto experimental, esses vieses podem prejudicar a uniformidade do trabalho, exigindo um tamanho amostral que, muitas vezes, está fora das possibilidades do grupo de pesquisa.

Os enxertos utilizados em nosso experimento reproduziram bem a condição *large-for-size*, já que todos tinham GBWR acima de 4%. Alguns inclusive apresentavam tamanho bem acima do que se encontra na prática médica, com um dos enxertos chegando a mais de 8% de GBWR. Em parte, isso se deve a uma certa dificuldade em controlar com exatidão os tamanhos dos animais provenientes do fornecedor, pois é possível solicitar animais de uma determinada faixa de peso, mas não é possível determinar os pesos exatos. Mesmo assim, julgamos que os enxertos utilizados representam bem, inclusive de modo intensificado, os agravos devidos à desproporção.

O aperfeiçoamento da técnica de arterialização, a expansão dos grupos amostrais, tempos maiores de observação, além da pesquisa de outras variáveis que caracterizem a LIR, estão entre as perspectivas futuras deste grupo de trabalho. A dosagem de glutatona e sua correlação com a presença de radicais oxidativos já foi empregada em outras publicações para a análise da LIR(48) e também pode ser agregar mais informações em trabalhos futuros.

A motivação do nosso grupo de pesquisa sempre será essencialmente a busca constante pela superação das dificuldades impostas pela fascinante e desafiadora prática do transplante hepático pediátrico.

6 CONCLUSÃO

A técnica de arterialização usada neste trabalho provocou aumento expressivo da pressão na veia porta, mas não provocou aumentos expressivos no fluxo portal.

A arterialização da veia porta através de um shunt vascular pela cateterização de artéria e veia esplênica não reduziu a lesão de isquemia e reperfusão no contexto do estudo.

Ainda que de forma discreta, houve indícios de um papel protetor da arterialização, já que os animais do grupo ART tiveram maior expressão dos genes de IL6 e cFOS, além de menor expressão dos genes de ICAM.

Maiores fluxo e pressão portal apresentaram associação, ainda que pouco expressiva, com a redução de marcadores da lesão de isquemia e reperfusão.

É importante continuar a pesquisa pelo aprimoramento da técnica e estudos mais específicos de suas implicações. Como propostas para prosseguir esta linha de pesquisa, podemos citar a manutenção dos animais vivos por mais tempo, com auxílio da Unidade de Terapia Intensiva veterinária. A participação de profissionais de bioengenharia também pode agregar qualidade na elaboração de dispositivos destinados à arterialização, vez que as características dos materiais utilizados podem influenciar os achados hemodinâmicos.

7 FINANCIAMENTO E OUTROS APOIOS

O projeto contou ainda com apoio financeiro da FAPESP, sob Processo nº 2016/19098-9, com o objetivo da compra dos materiais de laboratório e animais para a concretização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from live donors. *Lancet*. 2. England 1989. p. 497.
2. Tannuri A, Braga P. O implante de um fígado desproporcionalmente grande pode aumentar a incidência de complicações após o transplante hepático em crianças portadoras de atresia de vias biliares? 16º Congresso Brasileiro de Gastroenterologia Pediátrica. Vitória - ES 2016.
3. Tanaka A, Tanaka K, Tokuka A, Kitai T, Shinohara H, Hatano E, et al. Graft size-matching in living related partial liver transplantation in relation to tissue oxygenation and metabolic capacity. *Transpl Int*. 1996;9(1):15-22.
4. Rangel Moreira Dde A, Aoun Tannuri AC, Belon AR, Mendonça Coelho MC, Oliveira Gonçalves J, Serafini S, et al. Large-for-size liver transplantation: a flowmetry study in pigs. *J Surg Res*. 2014;189(2):313-20.
5. Addeo P, Noblet V, Naegel B, Bachellier P. Large-for-Size Orthotopic Liver Transplantation: a Systematic Review of Definitions, Outcomes, and Solutions. *J Gastrointest Surg*. 2020;24(5):1192-200.
6. Allard MA, Lopes F, Frosio F, Golse N, Sa Cunha A, Cherqui D, et al. Extreme large-for-size syndrome after adult liver transplantation: A model for predicting a potentially lethal complication. *Liver Transpl*. 2017;23(10):1294-304.
7. Kiuchi T, Kasahara M, Uryuhara K, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, et al. Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. *Transplantation*. 1999;67(2):321-7.
8. Grabhorn E, Schulz A, Helmke K, Hinrichs B, Rogiers X, Broering DC, et al. Short- and long-term results of liver transplantation in infants aged less than 6 months. *Transplantation*. 2004;78(2):235-41.
9. Shirouzu Y, Kasahara M, Morioka D, Sakamoto S, Taira K, Uryuhara K, et al. Vascular reconstruction and complications in living donor liver

transplantation in infants weighing less than 6 kilograms: the Kyoto experience. *Liver Transpl.* 2006;12(8):1224-32.

10. Otte JB, Reynaert M, De Hemptinne B, Geubel A, Carlier M, Jamart J, et al. Arterialization of the portal vein in conjunction with a therapeutic portacaval shunt. Hemodynamic investigations and results in 75 patients. *Ann Surg.* 1982;196(6):656-63.

11. Nardo B, Puviani L, Caraceni P, Montalti R, Pacilè V, Bertelli R, et al. Technical aspects of portal vein arterialization for acute liver failure: from rat lab to man. *Transplant Proc.* 2006;38(4):1195-7.

12. Ogata A, Miyazaki M, Ohtawa S, Ohtsuka M, Nakajima N. Short-term effect of portal vein arterialization on hepatic protein synthesis and endotoxaemia after extended hepatectomy in dogs. *J Gastroenterol Hepatol.* 1997;12(9-10):633-8.

13. Shimizu Y, Miyazaki M, Shimizu H, Ito H, Nakagawa K, Ambiru S, et al. Beneficial effects of arterialization of the portal vein on extended hepatectomy. *Br J Surg.* 2000;87(6):784-9.

14. Bhangui P, Salloum C, Lim C, Andreani P, Ariche A, Adam R, et al. Portal vein arterialization: a salvage procedure for a totally de-arterialized liver. The Paul Brousse Hospital experience. *HPB (Oxford).* 2014;16(8):723-38.

15. Guo SH, Li CH, Chen YL, Song JN, Zhang AQ, Zhou C. Effects of partial portal vein arterialization on the hilar bile duct in a rat model. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2011;10(5):533-8.

16. Majlesara A, Ghamarnejad O, Khajeh E, Golriz M, Gharabaghi N, Hoffmann K, et al. Portal vein arterialization as a salvage procedure in hepatopancreatobiliary surgery: a systematic review. *Can J Surg.* 2021;64(2):E173-E82.

17. Soares ROS, Losada DM, Jordani MC, Évora P, Castro-E-Silva O. Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20).

18. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol.* 1991;260(3 Pt 1):G355-62.

19. Uhlmann D, Uhlmann S, Spiegel HU. Endothelin/nitric oxide balance influences hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36(5 Suppl 1):S212-4.

20. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. *World J Gastroenterol*. 2013;19(11):1683-98.
21. Moreira DdAR. Transplante hepático large-for-size porcino com modulação do fluxo venoso portal: estudo hemodinâmico, histológico e biomolecular. In: Tannuri ACA, editor. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina; 2016.
22. Klune JR, Tsung A. Molecular biology of liver ischemia/reperfusion injury: established mechanisms and recent advancements. *Surg Clin North Am*. 2010;90(4):665-77.
23. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez F, Lopez F. Role of Kupffer cells in neutrophil activation and infiltration following total hepatic ischemia and reperfusion. *Circ Shock*. 1994;42(4):204-9.
24. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol*. 1994;145(6):1421-31.
25. Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology*. 1992;15(3):507-14.
26. Theruvath TP, Zhong Z, Currin RT, Ramshesh VK, Lemasters JJ. Endothelial nitric oxide synthase protects transplanted mouse livers against storage/reperfusion injury: Role of vasodilatory and innate immunity pathways. *Transplant Proc*. 2006;38(10):3351-7.
27. Leal AJ, Tannuri AC, Belon AR, Guimarães RR, Coelho MC, Oliveira Gonçalves J, et al. A simplified experimental model of large-for-size liver transplantation in pigs. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(8):1152-6.
28. Kobayashi E, Hishikawa S, Teratani T, Lefor AT. The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University. *Transplant Res*. 2012;1(1):8.
29. Leal AJ, Tannuri AC, Belon AR, Guimarães RR, Coelho MC, Gonçalves Jde O, et al. Effects of ischemic preconditioning in a pig model of large-for-size liver transplantation. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015;70(2):126-35.

30. Torres RR, Tannuri ACA, Serafini S, Belon A, Gonçalves JO, Loreto CD, et al. Does Arterialization of Portal Vein Have Any Effects in Large-for-Size Liver Transplantation? Hemodynamic, Histological, and Biomolecular Experimental Studies. *J Invest Surg.* 2022;35(6):1197-207.
31. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology.* 2003;125(4):1246-57.
32. Spiegel HU, Schleimer K, Freise H, Diller R, Drews G, Kranz D. Organ preservation with EC, HTK, and UW, solution in orthotopic rat liver transplantation. Part II. Morphological study. *J Invest Surg.* 1999;12(4):195-203.
33. Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, et al. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol.* 1998;143(1):217-24.
34. Xiao JS, Cai FG, Niu Y, Zhang Y, Xu XL, Ye QF. Preconditioning effects on expression of proto-oncogenes c-fos and c-jun after hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2005;4(2):197-202.
35. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science.* 1996;274(5291):1379-83.
36. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation.* 1992;53(5):957-78.
37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
38. Kanazawa H, Sakamoto S, Fukuda A, Shigeta T, Loh DL, Kakiuchi T, et al. Portal vein reconstruction in pediatric living donor liver transplantation for patients younger than 1 year with biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 2012;47(3):523-7.
39. Lautt WW. Regulatory processes interacting to maintain hepatic blood flow constancy: Vascular compliance, hepatic arterial buffer response, hepatorenal reflex, liver regeneration, escape from vasoconstriction. *Hepatol Res.* 2007;37(11):891-903.

40. Eipel C, Abshagen K, Vollmar B. Regulation of hepatic blood flow: the hepatic arterial buffer response revisited. *World J Gastroenterol.* 2010;16(48):6046-57.
41. Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt JF. Expression of c-fos and c-jun during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology.* 1996;23(6):1546-55.
42. Camargo CA, Jr., Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology.* 1997;26(6):1513-20.
43. Coelho MC, Tannuri U, Tannuri AC, Mello ES, dos Santos NA. Expression of interleukin 6 and apoptosis-related genes in suckling and weaning rat models of hepatectomy and liver regeneration. *J Pediatr Surg.* 2007;42(4):613-9.
44. Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Leukoc Biol.* 1995;57(3):368-74.
45. Ben-Ari Z, Pappo O, Cheporko Y, Yasovich N, Offen D, Shainberg A, et al. Bax ablation protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Liver Transpl.* 2007;13(8):1181-8.
46. Troisi R, de Hemptinne B. Clinical relevance of adapting portal vein flow in living donor liver transplantation in adult patients. *Liver Transpl.* 2003;9(9):S36-41.
47. Hessheimer AJ, Fondevila C, Taurá P, Muñoz J, Sánchez O, Fuster J, et al. Decompression of the portal bed and twice-baseline portal inflow are necessary for the functional recovery of a "small-for-size" graft. *Ann Surg.* 2011;253(6):1201-10.
48. Suzuki M, Fukuhara K, Unno M, Htwe T, Takeuchi H, Kakita T, et al. Correlation between plasma and hepatic phosphatidylcholine hydroperoxide, energy charge, and total glutathione content in ischemia reperfusion injury of rat liver. *Hepatogastroenterology.* 2000;47(34):1082-9.