

# ALOTRANSPLANTE CARDÍACO EM RATOS: COMPLICAÇÕES CIRÚRGICAS E SOBREVIDA DO ENXERTO

*HEART TRANSPLANTATION IN RATS: SURGICAL COMPLICATIONS AND ALLOGRAFT SURVIVAL*

Adauto J. Cologna<sup>1</sup>, Antônio Carlos P. Martins<sup>1</sup>, Haylton J. Suaid<sup>1</sup>,  
Maria Ângeles S. Llorach-Velludo<sup>2</sup>

Docentes<sup>1,2</sup> dos Departamentos de: Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia<sup>1</sup> e Patologia<sup>2</sup> da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

CORRESPONDÊNCIA: Adauto José Cologna. Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - 9º andar - sala 934 - Campus Universitário - CEP 14048-900 - Ribeirão Preto - SP; FAX (016) 633.0836.

COLOGNA AJ et al. Alotransplante cardíaco em ratos: complicações cirúrgicas e sobrevida do enxerto. **Medicina, Ribeirão Preto**, 29: 285-290, abr./set. 1996.

**RESUMO:** O objetivo desta apresentação é o de relatar as complicações cirúrgicas ocorridas no intra-operatório e, a sobrevida do coração transplantado.

Os autores realizaram o alotransplante cardíaco heterotópico, utilizando, como doadores, ratos Wistar e, como receptores, ratos Holtzman. A técnica utilizada foi a descrita por Ono e Lindsey, empregando-se fio de seda 7.0 para as anastomoses vasculares.

Foram operados 56 animais: em 41, obteve-se sucesso na cirurgia (73%); em 15, o resultado foi insatisfatório (26%). Dentre as complicações responsáveis pelo insucesso foram observadas: hemorragia arterial (6/15), trombose venosa (2/15), trombose coronariana (2/15) e perda do órgão caracterizada pela ausência de batimentos cardíacos (5/15). O tempo de isquemia total foi de 57,6 minutos e o tempo médio gasto para realização das suturas vasculares foi de 44,6 minutos. O diagnóstico da rejeição foi feito pela ausência de batimentos cardíacos à palpação do abdome. A sobrevida média do enxerto foi de 10,4 dias. Não foi empregada nenhuma medida imunossupressora. Os exames histopatológicos realizados nos corações rejeitados mostraram alterações conseqüentes à agressão imunológica (infiltrado mononuclear, necrose de fibras do miocárdio, edema e aumento de tamanho).

Apesar da ocorrência de complicações intra-operatórias, este é um modelo simples que pode contribuir para o estudo da imunologia.

**UNITERMOS:** Transplante Cardíaco. Transplante Homólogo. Ratos

## INTRODUÇÃO

O transplante de um órgão funcionante com vascularização intacta pode permitir a diferenciação das alterações imunopatológicas precoces das mudanças associadas com necrose isquêmica e, pode ainda, permitir que se façam alterações no estado imune do receptor, na tentativa de prolongamento da sobrevida do órgão transplantado.

O modelo experimental de transplante cardíaco em ratos, conforme descrito por Abbot e cols<sup>1</sup>, e o modelo descrito por Ono & Lindsey, 1969<sup>2</sup>, mostraram-se eficientes para o estudo da imunologia dos transplantes. Estes modelos permitem o diagnóstico preciso do fenômeno da rejeição e são de realização técnica relativamente simples.

O transplante renal em ratos é outro modelo para o estudo da imunologia dos enxertos, porém

esbarramos em uma série de dificuldades técnicas na realização do próprio transplante (vasos mais finos, além da necessidade de reconstrução do trato urinário), como também poderemos encontrar dificuldades no diagnóstico da rejeição<sup>3</sup>. Isto não acontece com o transplante cardíaco, no qual basta palpar o abdome do animal, diariamente, para certificar-se de que o órgão foi ou não rejeitado, quando a ausência de batimentos permite diagnóstico da rejeição<sup>4/8</sup> e a viabilidade do enxerto pode ser facilmente constatada.

O alotransplante de pele e subcutâneo, em ratos com anastomoses vasculares, tem sido também empregado para o estudo dos fenômenos imunológicos. Porém, este modelo é de realização técnica mais difícil, visto que, para se atingir um bom desempenho, torna-se necessária a realização de mais de 200 transplantes. Para manter a eficiência e não perder o treinamento, o cirurgião deve fazer uma anastomose por dia<sup>9</sup>. Além disso, como desvantagem adicional deste, cita-se a necessidade do uso de um microscópio com aumento de 8-10 x<sup>9/11</sup>.

Do exposto, fica patente que o alotransplante cardíaco em ratos é mais vantajoso que os demais, podendo ser de valia não somente para os indivíduos interessados no estudo da imunologia de transplantes, mas também para aqueles que se dedicam às técnicas de microcirurgia, fornecendo-lhes um treinamento mecânico adequado.

Existem outros modelos experimentais para o estudo da imunologia com a utilização de animais de maior porte, facilitando o ato cirúrgico. Porém, analisando-se os inconvenientes da obtenção e manutenção desses animais no biotério (tanto de ordem material como econômica), e comparando-se com ratos, verifica-se que, em todos os aspectos, a manutenção destes últimos é mais vantajosa.

Apesar do modelo de transplante cardíaco em ratos ter sido descrito há alguns anos, os dados existentes, na literatura, no que diz respeito a índices de sucesso e de complicações, são bastante escassos.

O objetivo deste trabalho é mostrar não apenas os resultados positivos, mas, principalmente, as complicações que surgiram no transcórrer dessa cirurgia, bem como a sobrevivência do enxerto, sem que se tenha alterado o estado imune do receptor.

## MATERIAL E MÉTODOS

Como doadores foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos, de peso entre 200 e 400 g e, como

receptores, ratos Holtzman machos, pesando entre 200-400 g. Os animais foram submetidos à anestesia geral com éter sulfúrico, sob a forma de inalação com auxílio de um funil. A técnica utilizada para o transplante cardíaco foi a descrita por Ono e Lindsey<sup>2</sup>.

Após a realização de uma incisão abdominal longitudinal e afastando-se as alças intestinais, fez-se a exposição da aorta abdominal e veia cava inferior do receptor. Esses vasos foram dissecados e pinçados num único bloco, com auxílio de uma pinça de Lee. Procedeu-se, a seguir, a abertura longitudinal dos mesmos.

O coração do doador foi retirado através de uma toracotomia. Após a ligadura da veia cava superior e veia cava inferior, distalmente, com fio de algodão 000, o passo seguinte foi o de seccionar a aorta. Isso feito, procedeu-se à perfusão do órgão com 7 a 10 ml de solução de NaCl a 0,9% (temperatura ambiente), injetados através da veia cava inferior. A seguir foi feita a ligadura da veia cava inferior, proximalmente em relação ao ponto de punção. As veias pulmonares foram ligadas num único bloco com fio de algodão 000. O passo seguinte foi a secção da artéria pulmonar e a secção da veias pulmonares, distalmente à ligadura.

O coração transplantado foi colocado heterotopicamente no abdome do receptor. Para o restabelecimento da circulação do órgão, fez-se a anastomose da aorta e artéria pulmonar do doador, respectivamente na aorta abdominal e veia cava inferior do receptor, com sutura contínua de fio de seda 7.0 término-lateralmente.

Com a retirada da pinça de Lee, o coração volta a ser perfundido com sangue, retornando os batimentos cardíacos (Figura 1).

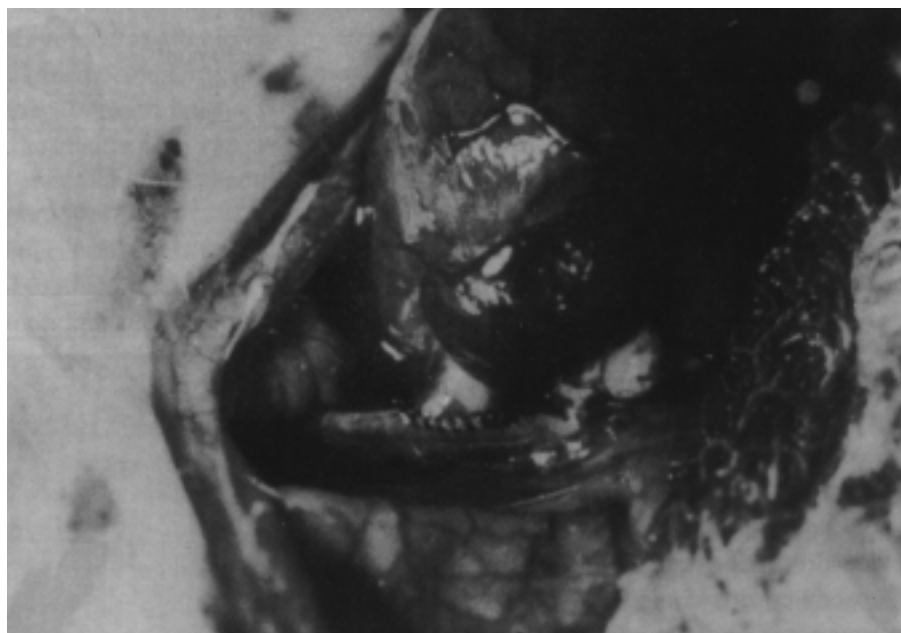
O fechamento da parede abdominal foi feito em 2 planos, com sutura contínua de fio de nylon monofilamentar 4.0, no peritônio e musculatura e, pontos separados do mesmo fio, na pele.

A cirurgia teve início pelo receptor, para diminuir o tempo de isquemia e, durante o ato cirúrgico, não houve preocupação com as técnicas de assepsia e antisepsia, tampouco foi utilizado material esterilizado. Na realização das anastomoses vasculares não se empregou lupa ou microscópio.

Não foi usada qualquer medida imunossupressora.

Diariamente foi feita a palpação do abdome do animal para a verificação dos batimentos do coração. Constatando-se ausência de batimentos nos aloen-

xertos cardíacos, os animais foram anestesiados e, após a abertura do abdome, procedeu-se exame cuidadoso do coração transplantado e das anastomoses. Com a comprovação da parada cardíaca e anastomoses pérvias, o animal foi sacrificado e, a seguir, fez-se a retirada do coração transplantado e do coração autóctone para exame histopatológico. Para tanto, os corações foram cortados e fixados em solução de formalina a 10%, os fragmentos foram envolvidos em parafina, cortados em micrótomos e corados com hematoxilina-eosina.



**Figura 1:** Aspecto cirúrgico do transplante cardíaco. Anastomose aorta-aorta após retirada da pinça. Os vasos coronarianos estão perfundidos; observa-se o átrio E túrgido.

## RESULTADOS

Foram operados 56 animais, sendo que, em 41, obteve-se sucesso na cirurgia (73,2%), em 15 (26,7%), o resultado foi insatisfatório. Dentre as complicações responsáveis pelo insucesso da cirurgia (15/56), tivemos hemorragia arterial (6/15), trombose venosa (2/15), trombose coronariana (2/15) e, perda do órgão (5/15). A perda do enxerto foi caracterizada pela ausência de batimentos cardíacos após a remoção da pinça vascular (Tabela I).

O tempo de isquemia total foi de 57,6 minutos (SD 6,74), o tempo médio gasto para a realização das suturas vasculares foi de 44,6 minutos (SD 5,91). Com a retirada da pinça vascular, os corações foram novamente perfundidos com sangue e, após 98,8 segundos (em média), os batimentos cardíacos voltaram ao normal. Em menos da metade dos casos, ou seja, em 21/51, o coração apresentou fibrilação ventricular, retornando ao ritmo regular espontaneamente ou por meio de massagens delicadas. (Tabela II).

**Tabela I: Causas de insucesso técnico do alotransplante cardíaco em ratos (15/56)**

	Hemorragia Arterial	Trombose Venosa	Trombose Coronariana	Perda do Enxerto	Total
(f)	6	2	2	5	15
(f%)	40%	13,3%	13,3%	33,3%	100%

f: número de complicações.

**Tabela II: Média e desvio padrão dos diferentes tempos observados durante a realização do alo-transplante cardíaco**

	Tempo * Isquemia Quente	Tempo* Isquemia Fria	Tempo* Isquemia Total	Tempo* Anastomoses Vasculares	Tempo** Ritmo Normal
Média	5,52	52,1	57,6	44,6	98,8
Desvio Padrão	1,72	6,73	6,74	5,91	40,71

\* Tempo em minutos

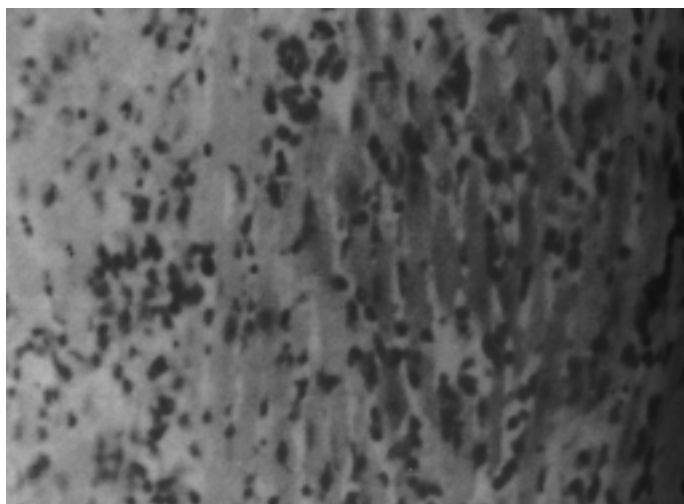
\*\* Tempo em segundos

Com o passar dos dias, notamos, à palpação abdominal, aumento do órgão transplantado, chegando a atingir duas vezes o tamanho normal. A ausência de batimentos à palpação, confirmada pela laparotomia, é o marco da sobrevivência do órgão (rejeição). O exame macroscópico dos corações rejeitados mostrou aumento de tamanho, palidez e edema. O corte longitudinal mostrou um coração com aumento das câmaras esquerdas e com trombos no interior das mesmas. Nenhum animal apresentou sinais de trombose, ao nível das anastomoses, durante o processo de rejeição. Os achados microscópicos foram uniformes nos corações rejeitados, existindo áreas de necrose e perda da arquitetura normal do órgão. As fibras do miocárdio, em algumas áreas, apresentavam vários graus de alterações degenerativas, entremeadas de intenso infiltrado mononuclear, predominando macrófagos (Figura 2) Nas arteríolas havia intensa proliferação da camada íntima (Figura 3). Os corações próprios dos animais não apresentaram alterações histológicas.

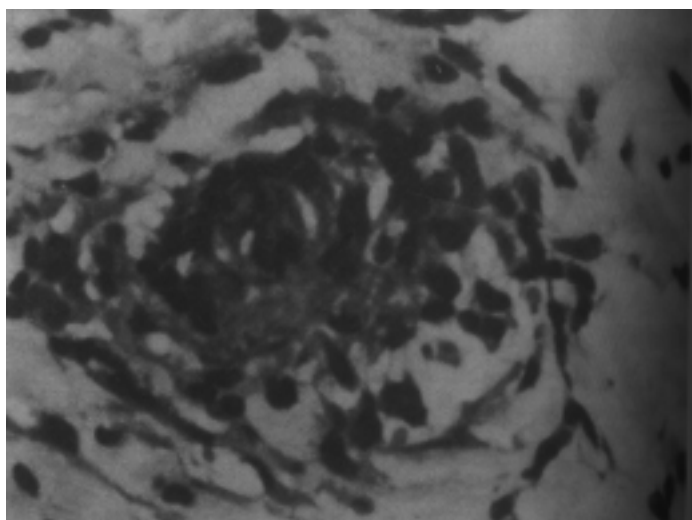
A sobrevivência média do alotransplante cardíaco, observada com este par doador-receptor, foi de 10,4 dias.

## DISCUSSÃO

Até há pouco tempo, o estudo da imunologia dos transplantes em animais dependia do uso de pele ou de tumores



**Figura 2:** Aspecto microscópico de coração rejeitado. Observa-se intenso infiltrado inflamatório mononuclear, com desarranjo na arquitetura das fibras musculares. Coloração HE. Aumento 100 X.



**Figura 3:** Aspecto microscópico de uma arteríola de coração rejeitado. Há intensa proliferação da camada íntima, com obliteração quase total da luz do vaso. Infiltrado perivascular do tipo mononuclear. Coloração HE. Aumento 400 X

sólidos transplantáveis<sup>(12)</sup>. Nenhum desses sistemas é ideal para o estudo das alterações imunopatológicas precoces, sendo impossível distinguir essas alterações daquelas, devido à necrose isquêmica do enxerto, durante o processo de revascularização. Dessa forma, o aparecimento de técnicas de transplante com vascularização, particularmente do transplante cardíaco, muito auxiliou o estudo da imunologia.

É bem verdade que foi necessário um treinamento prévio para se conseguir êxito com o alotransplante cardíaco. Mesmo após ter adquirido experiência e habilidade, o índice de sucesso cirúrgico girou em torno de 73%. Esse índice é inferior ao da literatura que mostra taxa ao redor de 95%<sup>13</sup>, mas essa taxa de insucesso de 5% se refere a enxertos que perderam os batimentos cardíacos dentro de 3 dias após o transplante. Não há referências sobre o percentual de órgãos perdidos durante o ato cirúrgico ou imediatamente após a retirada da pinça vascular.

As causas de perda de enxerto por nós observadas foram várias. A mais freqüente foi a hemorragia. A perda de 20% do volume sanguíneo total é suficiente para a morte do animal<sup>1</sup>.

O tempo de isquemia total foi em média 57,6 minutos, suplantando o observado na literatura, que varia de 25-45 minutos<sup>13,14</sup>. Esse tempo de isquemia prolongado pode ser uma explicação plausível para a perda de alguns corações que nunca apresentaram batimentos. Porém não há dados que permitam afirmação categórica a respeito.

O tempo decorrido, entre a remoção da pinça vascular com restabelecimento da circulação do órgão e o reinício dos batimentos cardíacos, está em torno de 120 segundos<sup>14</sup>. Em nosso experimento esse tempo foi de 98,8 segundos.

A sobrevida do alotransplante cardíaco em ratos, observada na literatura, varia de 6 a 13 dias<sup>15/23</sup>, dependendo das linhagens do par doador-receptor. Isso, na realidade, reflete o grau de histocompatibilidade entre as linhagens envolvidas no transplante<sup>24/27</sup>. Quando se tomam ratos Wistar, quer como doadores ou receptores, a sobrevida do enxerto varia de 6 a 11 dias<sup>13,14,28/30</sup>. A sobrevida do alotransplante cardíaco por nós observada foi de 10,4 dias, portanto, de acordo com a literatura.

Os aspectos histopatológicos dos corações rejeitados foram semelhantes aos relatados por outros autores que descrevem infiltrado linfocitário e de macrófagos, necrose de fibras do miocárdio, edema e aumento de tamanho<sup>24-31/35</sup>, sendo essas alterações conseqüentes à agressão imunológica.

## CONCLUSÃO

Apesar de apresentar um índice de sucesso de 73%, devido às complicações intra-operatórias, o alotransplante cardíaco é um modelo experimental relativamente simples, podendo contribuir, nos estudos imunológicos, sobre a rejeição de órgãos transplantados.

COLOGNA AJ et al. Heart transplantation in rats: surgical complications and allograft survival. **Medicina, Ribeirão Preto**, 29: 285-290, apr./sept. 1996.

**ABSTRACT:** The aim of this research was to study the technical aspects of cardiac allotransplant in rats according to the method described by Ono & Lindsey. It was used Holtzman rats as recipients and Wistar rats as donors.

We carried out 56 transplants. In 41 (73%) recipients the surgery gave excellent results, while in 15 (28%) the heart allograft was lost due to technical failure: excessive bleeding (6/15), venous thrombosis (2/15), arterial thrombosis (2/15) and lack of beating (5/15).

The mean time of total ischaemia was 57,6 minutes. The vascular anastomosis was done in 44,6 minutes as a mean time.

The diagnosis of cardiac rejection was done when the palpation of the abdomen recipient's showed lack of heart beating. The mean of survival time of cardiac allotransplant was 10,4 days.

Histology of transplanted hearts removed after diagnosis of rejection exhibited typical immunologic injury (augmentation of heart size, oedema, necrosis of muscle fibers, infiltration by immunocompetent cells).

**UNITERMS:** Heart Transplantation. Transplantation, Homologous. Rats

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ABBOTT CP et al. A technique for heart transplantation in the rat. **Arch Surg** **89**:645-652, 1964.
- 2 - ONO K & LINDSEY ES. Improved technique of heart transplantation in rats. **J Thorac Cardiovasc Surg** **57**:225-229, 1969.
- 3 - FISHER B & LEE S. Microvascular surgical techniques in research with special reference to renal transplantation in the rat. **Surgery** **58**:904-914, 1965.
- 4 - AMIRHANZEH MMR et al. Diastolic function in the heterotopic rat heart transplant model. **J Thorac Cardiovasc Surg** **108**: 928-937, 1994.
- 5 - BRAXTON JH et al. Effect of supercooling solutions on eletromechanical activity. **Transplant Proc** **28**:2428-2429, 1994.
- 6 - FERRARESSO M et al. Rapamycin inhibito production of cytotoxic but not noncytotoxic antibodies and preferentially activates T helper 2 cells that mediate long-term survival of heart allografts in rats. **J Immunol** **153**:3307-3318, 1994.
- 7 - KNIGHT RJ et al. Rapamycin, cyclosporine and perioperative donor-specific transfusion induce prolongation of cardiac allograft survival in the rat. **Transplantation** **58**:1014-1020, 1994.
- 8 - MOTTRUM PL et al. Electrocardiographic monitoring of cardiac transplants in mice. **Cardiovasc Res** **22**:315-321, 1988.
- 9 - SALYER KE & KUGER ER. Studies in rats of survival of composite homotransplants of skin and subcutaneous tissue, with microvascular anastomoses. **Plast Reconstr Surg** **51**:672-681, 1973.
- 10 - CHO SI et al. A new model for study of allograft rejection in the rat: use of skin with an intact vascular pedicle. **Transplantation** **13**:486-492, 1972.
- 11 - STRAUCH B & MURRAY DE. Transfer of composite graft with immediate suture anastomosis of its vascular pedicle measuring less than 1 mm in external diameter using microsurgical techniques. **Plast Reconstr Surg** **40**:325-329, 1967.
- 12 - ABBOTT CP et al. The transplanted rat heart. Histologic and eletrocardiographic chances. **Transplantation** **3**:432-435, 1965.
- 13 - STEPKOWSKI SM et al. Rapamycin a potente immunosuppressive drug for vascularized heart, kidney and small bowel transplantation in the rat. **Transplantation** **51**:22-66, 1991.
- 14 - HALL BM et al. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. **J Exp Med** **162**:1683-1694, 1985.
- 15 - BINDER J et al. Prolongation of cardiac allograft survival in rats by liposome.-encapsulated methylprednisolone. **Transplantation** **58**:633-635, 1994.
- 16 - BOECKX W et al. Prolongation of allogenic heart graft survival in the rat after implantation on portal vein. **Transplantation** **19**:145-149, 1975.
- 17 - GUTTMANN RD & FALK RE. The effect of receipient thymectomy in rat cardiac rejection. **Transplantation** **17**:228-231, 1974.
- 18 - JAMIESON SW. Promethazine HCl (phenergan) in the treatment of rat cardiac allografts. **Transplantation** **21**:69-71, 1976.
- 19 - MILLER CM et al. Prolongation of rat cardiac allografts by pretransplant administration of blood transfusion and cyclosporine A. **Transplantation** **33**:335-337, 1982.
- 20 - PADBERG WM et al. Synergi between subtherapeutic doses of cyclosporine and immunologic enhancement in rat recipients of cardiac allografts. **Transplantation** **45**:162-168, 1988.
- 21 - TAKIFF H et al. Low dose cyclosporine maintenance therapy after immunosuppressive induction in rat cardiac transplant model. **Transplantation** **45**:297-301, 1988.
- 22 - TIANG H et al. The effect of the immunologic marker RT2 on cardiac and renal allograft rejection in the rat. **Transplantation** **58**:1137-1139, 1994.
- 23 - TILNEY NL et al. Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac in inbred rats. **Transplantation** **20**:323-330, 1975.
- 24 - HERON I. The iso and allotransplanted rat heart. *Acta Pathol Microbiol Scand(A)* **80**:9-16, 1972.
- 25 - KAWABE K et al. Renal transplantation in the inbred rat. **Transplantation** **13**:21-26, 1972.
- 26 - TILNEY NL & BELL PRF. Studies on enhancement of cardiac and renal allografts in the rat. **Transplantation** **18**:31-37, 1974.
- 27 - WHITE E. Cronic kidney allograft reaction in rats. **Transplantation** **8**:602-617, 1969.
- 28 - BEKKUM DW et al. Effect of immunosuppressive treatment on rejection of heart allografts in rats. **Transplantation** **8**:678-688, 1969.
- 29 - MIYAGAWA S et al. In vitro correlates of in vivo therapy with cyclosporine to immunosuppress rejection of heterotopic rat cardiac allografts across strong (RT-1) plus weak (non RT-1) histocompatibility differences. **Transplantation** **52**:851-857, 1991.
- 30 - RAJU P et al. Prolongation of cardiac allograft survival with transforming growth factor-b in rats. **Transplantation** **58**:392-395, 1994.
- 31 - MACPHERSON SG et al. Nature of cells removed from rejecting rat cardiac allografts. **Brit J Surg** **62**:155, 1975.
- 32 - MACSWEEN RNM et al. Immunological and histological studies of ectopic heart transplants in the rat. **J Pathol** **105**:49-56, 1971.
- 33 - MJÖRNSFEDT L et al. Induction of long-term heart allograft survival in the rat by rabbit ATG. **Int Arch Allergy Appl Immunol** **74**:193-199, 1984.
- 34 - TILNEY NL et al. Studies on infiltrating hart cells harvested from acutely rejecting rat cardiac allografts. **Surgery** **27**:209-217, 1976.
- 35 - TILNEY NL. The extend of immunological injury to the vasculature of cardiac allografts in the rat. **Transplantation** **17**:561-567, 1974.

Recebido para publicação em 18/12/95

Aprovado para publicação em 22/08/96