

Artículo Original

Trasplante experimental de hígado en cerdos. Aplicación de Protocolos quirúrgicos

Experimental liver transplantation in pigs. Application of Surgical protocols

Dr. Alejandro Giménez V. * **Guido Parquet V. ***, **David Brunstein, **** **Oscar Doria, **** **Omar Aguayo ****** **D., Rodney Díaz,** **Rosa Sánchez A,** **Rubén Rojas,** **Oscar Torres,** **Miguel Caballero,** **Pablo Goto,** **Waldor Acuña A., Heidi Cáceres,** **Roberto Rodríguez,** **Aníbal Filártiga L. ******

Julio Canata*, Fernando Centurión, Luis Leonardo López ***,** **Emanuel Llano*****

* Jefe de Sala ** Especialista *** Médico de Guardia Residente **** Jefe de Servicio y Cátedra. Primera Cátedra de Clínica Quirúrgica. Hospital de Clínicas FCM - UNA

* Jefe de Servicio ** Especialista *** Residente Departamento de Anestesiología. Hospital de Clínicas FCM - UNA

RESUMEN

Este proyecto de investigación, fue llevado a cabo entre los meses de Octubre 2004 – Enero 2005, buscando consolidar a un equipo multidisciplinario de trasplante de hígado, a fin de encontrar una solución a la problemática de la insuficiencia hepática en fase terminal. Se han aplicado protocolos de ablación, Back Table, hepatectomías e implante, a más de un protocolo de anestesia, respetando los preceptos de Bioética, para el manejo de animales de experimentación. Utilizamos 8 cerdos de raza Landrace, White Large o cruza, el peso promedio fue de 31.25 kg. Tres animales fueron usados como donantes de hígado y sangre (promedio 1066 cc/ animal) y tres fueron receptores; los otros dos fueron utilizados como banco de sangre. El tiempo operatorio de ablación utilizado fue en promedio de 1 hora y 23 minutos. Usamos 3000 cc de suero para el enfriado. Empleamos en promedio 3 horas y 12 minutos de cirugía en la hepatectomía y el implante. El tiempo de isquemia fría para el órgano donado fue en promedio de 3 horas y 7 minutos; las anastomosis vasculares las hicimos respetando estrictamente los protocolos, y la anastomosis biliodigestiva del tercer cerdo la realizamos mediante una colédocoyeyunoanastomosis en Omega. Concluimos que, es posible realizar cirugía experimental en el ámbito Universitario y debe ser realizado en la Facultad de Medicina

ABSTRACT

This research project was performed from October 2004 to January 2005, trying to strengthen a multidisciplinary team in liver transplantation, in order to find an answer to the problematic of end-stage liver failure. Protocols of anaesthesia, organ procurement, "Back Table" surgery, hepatic resection and implantation were applied considering bioethical precepts on experimental animal management. Eight Landrace or White Large pigs were used with a mean weight of 31.25 kg. Three animals were used as liver and blood donors (1066 cc/ animal) and three were organ recipients; the remaining two animals were used exclusively as blood supply. Mean organ procurement time was 1 hour and 23 minutes. We used 3000 cc of chilled saline solution for hypothermic organ preservation. Recipient hepatic resection and implantation of the donor liver was performed in a mean time of 3 hours and 12 minutes. Mean hypothermic ischemic time on the donor organ was 3 hours and 7 minutes; vascular anastomoses were performed following

strictly the protocols. In the third pig, biliary reconstruction was accomplished with a choledochojejunostomy on an enteric omega loop. We can conclude that experimental surgery is feasible in a university setting and it should be done in the Medical School.

INTRODUCCIÓN

El trasplante hepático abarca una sucesión de hechos, que involucra a una gran variedad de profesionales, en el que el acto central es la Cirugía, y cuyo desenlace depende de un equipo médico multidisciplinario bien entrenado; El trasplante de hígado surge como una posibilidad terapéutica para enfermos, cuya evolución natural es el óbito, con considerables gastos económicos y emocionales.

El primer trasplante heterotópico de hígado experimental, se realizó en perros en 1955 en Nueva York.

Desde aquellas experiencias, hasta nuestros días, el Trasplante de Hígado se ha consolidado como una realidad clínica, ya que en el año 1983 el Instituto Nacional de la Salud de EE.UU. determinó que se considere como un tratamiento convencional para pacientes afectados de insuficiencia hepática terminal.

En el Paraguay existe un número cada vez mayor de pacientes con hepatopatías de diversas etiologías y estadios, con todo el espectro de alteraciones funcionales y compromiso del estado general, sin que podamos darle solución definitiva a los casos irreversibles de insuficiencia hepática; sin embargo en el MERCOSUR, existen centros habituados a realizar trasplantes de hígado con resultados muy alentadores. A modo de ejemplo tenemos:

- Argentina: 8 centros – más de 80 Trasplantes hepáticos/año.
- Bolivia: 2 centros – 0.3 Trasplantes hepáticos por millón de población (2002).
- Brasil: 11 centros – más de 100/año.
- Chile: 3 centros – 5.7 trasplantes por millón de población (2006).
- Uruguay: 2 centros – 5 T.H. (2002).

En la Facultad de Ciencias Médicas hemos conformado un grupo de médicos que en años anteriores, efectuamos todas las etapas del trasplante hepático en cerdos, con resultados alentadores. El interés de nuestro grupo radica actualmente en continuar con el entrenamiento del manejo de los protocolos quirúrgicos, para la implementación de la fase clínica del Trasplante Hepático prevista como siguiente fase obvia de este programa.

Objetivo de la investigación

- Implementación de los protocolos quirúrgicos que se utilizan en las fases clínicas de un trasplante de hígado, aplicándolos en cirugías

experimentales en cerdos.

- Objetivar los tiempos utilizados en cada fase del trasplante hepático.

Material y método utilizado

- Modelos protocolizados de cirugía experimental (trasplante de hígado) en cerdos, con las correspondientes normas de Bioética.

Utilizamos 8 cerdos de raza Landrace, White Large o cruza, para la implementación de las cirugías experimentales; en cada cerdo consignamos los siguientes datos:

- Procedencia
- Sexo
- Peso
- Tiempo de ayuno
- Premedicación

Implementamos Protocolos de Anestesia en Cirugía experimental en cerdos, para los donantes y receptores.

En los donantes aplicamos el Protocolo clásico de ablación rápida, y obtuvimos además, los siguientes datos:

- Duración del período operatorio.
- Anomalías de las estructuras anatómicas.
- Cantidad de sangre recogida para transfundir.
- Cantidad de sueros fríos usados.

En los animales receptores utilizamos el Protocolo de hepatectomía e implante donde además recabamos los siguientes datos:

- Duración del período operatorio
- Duración del período de isquemia fría
- Duración del período anhepático
- Duración de las anastomosis
- Cantidad de sangre transfundida
- Técnica de reconstrucción biliar
- Tiempo de sobrevida

Resultados obtenidos:

Entre el 04 y el 11 de enero de 2005 en el Hospital de Pequeños animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias, realizamos las sesiones de cirugía experimental, utilizando 8 cerdos para la ejecución de cirugías experimentales; 6 de los mismos fueron destinados para los trasplantes y 2 cerdos fueron donantes de sangre; los datos de los mismos pueden apreciarse en la **Tabla 1**.

En todos los casos tratamos de adquirir cerdos provenientes de Granjas reconocidas, libres de enfermedades, cuyo destino de cría es la faena para alimentación humana.

Cirugía en el Donante

En los cerdos donantes, aplicamos rigurosamente los protocolos de ablación rápida para el enfriamiento y ablación del hígado, y previo a esto extrajimos sangre de los mismos para transfundirlos al receptor; en todos los casos el donante fue Macho y el de menor

peso que teníamos en ese momento. Las estructuras anatómicas fueron disecadas con pericia, de tal manera a no tener lesiones en las estructuras vasculares

Posteriormente a la ablación, llevamos los hígados al Back Table, para prepararlos para el injerto, donde no tuvimos problemas de consideración.

El resultado de los datos analizados en la cirugía del donante, se ilustra en la **Tabla 2**.

Cirugía en el Receptor

En los animales receptores, una vez anestesiados según protocolo, hicimos accesos venosos y arteriales del lado derecho, para lo cual disecamos la vena yugular interna y la arteria cervical media, canalizándolas con catéteres K33 (de 0.3 cm de diámetro) para suministro de líquidos y medición de presión arterial media (T.A.M.). Además disecamos la Vena yugular interna del lado izquierdo, usándola para el By-pass Venó-Venoso.

El protocolo de anestesia que implementamos fue el mismo para todos, y las correcciones del equilibrio ácido-base, calcio y electrolitos las hicimos empíricamente ya que no contamos con laboratorio para estas determinaciones. Todos los animales fueron conectados a máquinas de anestesia y monitores intraoperatorios con ritmo electrocardiográfico, presiones venosas, y presión arterial invasiva

El resultado de los datos analizados se demuestra en la **Tabla 3**.

Análisis resumido de los resultados obtenidos

Los cerdos obtenidos de las dos diferentes Granjas, fueron del peso y tamaño necesarios y el ayuno al que fueron sometidos, a pedido nuestro, fue respetado a cabalidad; los animales ofrecieron conformación y aspecto correctos. Cabe resaltar la dificultad para conseguir animales de ese peso en la época del año que lo hicimos (inmediatamente posterior a las fiestas de Fin de Año).

La preparación para la cirugía del Donante no ofreció mayores complicaciones, toda vez que el cerdo esté debidamente premedicado, para un buen manejo e higiene. Las estructuras a disecar en cerdos de este peso, son las correctas y apropiadas. Las cirugías en el donante no presentan problemas, y en el caso de una duplicación de la arteria hepática (cerdos 2 y 3) disecamos ambas y utilizamos la de mayor calibre. En el segundo y tercer cerdo hemos hiperhidratado a los animales antes del clampar el pedículo hepático, y de esta manera conseguimos mayor volumen de sangre para trasfudir al receptor. Pusimos mucho empeño en mantener una buena hemodinamia durante todas las cirugías de ablación, a fin de preservar la función del hígado ablacionado. Es suficiente contar con 3 volúmenes de suero frío para conseguir buena decoloración y enfriamiento del hígado del donante

La cirugía en el receptor emplea mucho tiempo

Tabla 1. Datos analizados a los cerdos utilizados en trasplante experimental de hígado

| Cerdo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------|---------|----------|---------|----------|---------|---------|---------|----------|
| Peso | 28 | 32 | 32 | 34 | 30 | 30 | 32 | 32 |
| Sexo | M | M | M | F | M | M | M | H |
| Procede | Granja | Granja | Granja | Bacchet | Bacchet | Bacchet | Bacchet | Bacchet |
| Ayuno | 48 hs | 48 hs | 72 hs | 72 hs | 72 hs | 48 hs | 48 hs | 48 hs |
| Destino | Donante | Receptor | Donante | Receptor | Sangre | Donante | Sangre | Receptor |

Tabla 2. Resultados de los datos analizados en el cerdo donante

| Cerdo N° | T° Operatorio | Anomalías | Sangre p/trasf. | Suero fríos |
|----------|---------------|-----------------|-----------------|-------------|
| 1 | 90 min. | No | 800 ml | 3000 ml |
| 2 | 85 min | Doble art.hep. | 1200 ml | 3000 ml |
| 3 | 75 min | Doble art. hep. | 1200 ml | 3000 ml |

Tabla 3. Datos analizados en el cerdo receptor

| Cerdo | T° Op | T° Isq | T° Anh | T° Anast | Transf. | Anas Bil | T° Sobr |
|-------|---------|---------|---------|----------|---------|----------|---------|
| 1 | 170 min | 180 min | 80 min | 60 min | 2 vol | No | Óbito |
| 2 | 190 min | 220 min | 70 min. | 75 min | 6 vol | No | Óbito |
| 3 | 220 min | 162 min | 140 min | 54 min | 4 vol | Col-Yey | 120 min |

Ref.: T° Op: Duración del periodo operatorio - T° Isq: Duración del periodo de isquemia fría - T° Anh: Duración del periodo anhepático - T° Anast: Duración de las anastomosis - Trasf: Cantidad de sangre trasfundida - Anas Bil: Técnica de reconstrucción biliar - T° Sobr: Tiempo de sobrevida

de preparación entre la premedicación, higiene y lavado del animal y la intubación del mismo; en un caso (cerdo N° 2) tuvimos que cambiar de receptor ya que al que estaba siendo preparado fue imposible intubar. La disección de los vasos cervicales no es problema, pero debe hacerse con personal que conozca la anatomía y esté acostumbrado a manejar accesos venosos y arteriales. En el tercer cerdo tuvimos mucho cuidado en manejar los tiempos operatorios entre el donante y el receptor de manera a acortar los lapsos de isquemia total (de más de 3 hs. a 2 horas con 20 minutos); el tiempo empleado en las anastomosis, también fue importantemente reducido, a poco más de 45 minutos, con lo que conseguimos acortar el tiempo de fase anhepática; el primer cerdo fue al óbito durante la re-perfusión (anastomosis de la cava suprahepática, infrahepática y vena porta terminadas) con una hipotensión sostenida por falta de un adecuado volumen de sangre trasfundida y un by-pass veno-veno que no funcionó correctamente; en el segundo receptor, tuvimos problemas en conseguir sangre en el momento necesario, por lo que a pesar de trasfundir al cerdo 6 volúmenes, no teníamos buen manejo de la hemodinamia y fue al óbito una vez terminadas las anastomosis venosas y de la arteria hepática; tampoco tuvimos buen funcionamiento del by-pass veno-veno en este receptor.

En el tercer receptor contamos de entrada con 6 volúmenes de sangre para trasfundir, además de manejar el by-pass de forma manual (con la ayuda del anestesista) con lo que controlamos la hemodinamia de manera más ajustada; las anastomosis funcionaron perfectamente, y el calentamiento y recoloración del hígado se hicieron adecuadamente.

En este cerdo tuvimos un tiempo de supervivencia de 120 minutos, con parámetros hemodinámicos conformes (ritmo electrocardiográfico sin alteraciones, frecuencia aceptable, presiones arteriales normales) diuresis estándar, y posteriormente hemos desconectado el respirador ya que no contamos con Terapia para estos animales, habiendo completado los protocolos operatorios de forma correcta.

CONCLUSIONES

- El cerdo es un buen modelo para utilizar en trasplante ortotópico experimental de hígado, debido a la anatomía, resistencia a la manipulación, y fácil obtención en Granjas adecuadas.
- Deben utilizarse cerdos de peso alrededor de los 30 kg. para un mejor manejo de las estructuras vasculares y venosas.
- Se debe contar con un quirófano apropiado con los equipamientos necesarios para este

tipo de cirugía.

- Es imprescindible tener un banco de sangre, de al menos 6 volúmenes por receptor
- La cirugía en el donante es de fácil implementación aplicando el protocolo establecido de ablación rápida.
- Respetando las estructuras vasculares durante la ablación, el trabajo en el Back Table es fácil y de rápida ejecución.
- Es necesario contar con 3000 cc de suero frío (4 - 6 ° C) para un buen enfriamiento y descoloramiento del hígado.
- Ajustando los tiempos entre las cirugías del donante y del receptor se acortan al máximo los tiempos de isquemia del hígado donante.
- El by-pass veno-veno, debe ser de simple ejecución y controlarlo sistemáticamente durante todo el tiempo de su empleo.
- El manejo exitoso del by-pass veno-veno en este tipo de cerdos, es de extraordinaria importancia para mantener constantes hemodinámicas correctas.
- Al ajustarse al protocolo de cirugía en el receptor, y respetando las estructuras, se consiguen buenas anastomosis y en corto tiempo
- Es necesario poseer una terapia intensiva para mantener a estos animales en el postoperatorio.
- Se deben continuar con las siguientes fases de este proyecto, para evaluar resultados globales con sobrevivencias alejadas

APÉNDICE

A) PROTOCOLO DE ANESTESIA DE TRASPLANTE ORTOTÓPICO DE HIGADO EN CERDOS.

PREOPERATORIO.

- Ayuno de 48 hs., sólo agua
- MAP: Ketamina a 7.5 mg/kg IM
- Canalización de vena de oreja con Punzocath N° 22
- Preoxigenación con O₂ al 100% durante 5'
- Halotano al 3% durante 5'

1) Intubación sin ventilar con tubo n° 7 con manguito

- Mantenimiento: * halotano al 0.5 - 1 %
* Ketamina al 1% (500 mg. en 50 cc) por oreja Gotear 1ug./kp/min
* Dormicum 1 cc. en 5 cc para reforzar la hipnosis
- SNG K11
- Ventilación: 12 - 15 cc/kg., frecuencia 12 x'
- Canalización: * Venosa: Para Presión Ven-

nosa Central: Yugular Externa Der.- Catéter K33

Para líquidos - Cualquier otra D- Catéter

K33

Respetar la Yugular Interna

- * Arterial: Para Presión Arterial Media y muestras: Subclavia De. - Punzocath 20
 - Disección de la Arteria Carótida izquierda
 - Sangría : VS = Kg. X 70 cc (Volumen Sanguíneo)
- Presión Arterial Media Lavado con heparina 2500 u (0.5 cc) en 500 cc
- Monitoreo ECG- Oxímetro en oreja previo rasurado

INTRAOPERATORIO

- Hidratación: SF 10 cc/Kp/h
- Catéter K30 en Vejiga
- Sangre 500 cc antes del clampaje de las grandes venas

Monitoreo : ECG - TAM - PVC - OXIMETRIA - DIURESIS

B) MONITORIZACIÓN ANESTESICA DURANTE LA ABLACION (Ver tabla 4)

C) PROTOCOLO OPERATORIO DE HEPATECTOMIAS

Fecha: Peso: Cirujano:

Técnica: 1) Laparotomía: a) Xifopúbica; b) Bisubcostal. 2) Ampliación: a) transversa derecha; b) Transversa izquierda; c) Xifoidea; d) Infraumbilical. 3) Apertura del epiplón gastrohepático hasta el diafragma. 4) Disección de la VBP y sección de la misma. 5) Disección y referencia de la VP. 6) Disección de la hepática y tronco celiaco hasta la aorta y disección de la misma en al menos 5 cm con referencias proximales y distales; ligadura y sección de las hepáticas. 7) Disección de la VCIH y referencia. 8) Disección de la VCISH. 9) Clampaje y sección de la : VP -VCISH - VCIH 10) Hepatectomía.

Indemnidad de las estructuras: VCISH: d) Art. Receptor: VCIH; e) VBP: VP: Sangrado ; No Sí : cc Transfusión: No Sí Tipo: auto homo Uso de Bypass Tiempo quirúrgico de sobrevida Observaciones:

Tabla 4.

| | INICIAL | CLAMPADO | | ENFRIAMIENTO DE PORTA | | CLAMPADO DE A* Y VC | |
|----------|---------|----------|---|-----------------------|---|---------------------|---|
| PULSO | En min. | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ |
| PRESIÓN | Normal | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ |
| PVC | Normal | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ |
| DIURESIS | En CC | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ |

BIBLIOGRAFÍA

1. Giménez A., Samaniego C., Wattiez C., Centurión F., Mallorquin M., Moreno R., et al. "Trasplante hepático experimental en modelo animal: resultados preliminares de la fase I de un programa" Annual reports 1997; 86-93
2. Khan D., Hickman R., Pienaar H., Terblanche J., *Liver Transplantation in The Pig*, en Handbook of Animals Models in Transplantation Research, CRC Press, Inc. 1994 ; 75 - 85
3. Laino GM, Anastasi A, Fabbri LP, Gandini E, Valanzano R, Fontanari P, Venneri F, Mazzoni P, Ieri A, Spini S, Sealzi E, Batignani G *Experimental liver transplantation in pigs. Surgical technique and Complications*, Minerva Chir. 1996 Oct;51(10):765-72.
4. Gruttadauria S, Marino G, Catalano F, Sgroi AV, Di Mauro GL, Basile F., et al *Porcine orthotopic liver autotransplantation: facilitated technique*. J Invest Surg. 2001 Mar-Apr;14(2):79-82.
5. Bonofiglio F., *Anestesia en trasplante ortotópico de hígado experimental*. Rev. Arg. Anest. 1988, 46(2): 99-126
6. Tiberio L.C., *Experiencia da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica no programa de trapiante hepatico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Parana. Os primeros 20 casos*. Curitiba 1988
7. Visa I Miracle J., *Diseño, elaboración y puesta en marcha de un programa de Trasplante hepático*, en El Trasplante Hepático en el Hospital Clínic de Barcelona. J.R.Prous S.A. 1991; 9: 9 - 16
8. Kremer B. *Standar techniques in Orthotopic Liver Transplantation*, en Atlas of Liver, Pancreas, and kidney Transplantation, Thieme Medical Publishers, Inc. 1994; 36 - 54
9. De Santibañes E., Pekol J., Grondona J., Ciardullo M., Sivori J., Mattera F., *Programa de Trasplante Hepático en el hospital Italiano de Buenos Aires*, Pren.méd. argen. 1996 : 83 : 622 - 626