

Descrição e avaliação de modelos experimentais para transplante uterino em suínos

Description and evaluation of experimental models for uterine transplantation in pigs

Emerson de Oliveira¹, Kelly Alessandra da Silva Tavares¹, Mariano Tamura Vieira Gomes², Alcides Augusto Salzedas-Netto³, Marair Gracio Ferreira Sartori³, Rodrigo Aquino Castro³, César Eduardo Fernandes¹, Manoel João Batista Castello Girão³

RESUMO

Objetivo: Avaliar a técnica de transplante uterino e o uso de drogas no processo de imunossupressão. **Métodos:** Foram incluídas 12 porcas, sendo realizada imunossupressão com doses mínimas de ciclosporina, e prova cruzada para afastar a possibilidade de incompatibilidade sanguínea. Realizou-se, na doadora, histerectomia sob anestesia geral, com a retirada, em monobloco, da aorta e da veia cava inferior, de tal forma que, na receptora, fosse possível realizar a anastomose com estes vasos. **Resultados:** Foram realizados seis experimentos e, no pós-operatório imediato, houve boa reperfusão em cinco animais. Entretanto, no sétimo dia de pós-operatório, as análises histológicas demonstraram rejeição em cinco deles. **Conclusão:** O modelo experimental de transplante uterino é factível, mas a monitorização das doses de imunossupressores é importante, a fim de impedir os episódios de rejeição.

Descritores: Transplante; Útero/transplante; Infertilidade; Gravidez; Suínos; Modelos animais; Imunossupressores; Ciclosporina

ABSTRACT

Objective: To evaluate the technique of uterine transplantation and the use of drugs used in the process of immunosuppression. **Methods:** We included 12 sows, and immunosuppression was performed with minimal doses of cyclosporine, and cross-match was done to exclude the possibility of blood incompatibility. Hysterectomy was performed in the donor under general anesthesia, with the removal of the aorta and inferior vena cava in monobloc, and anastomosis of these vessels was made in the recipient. **Results:** Six experiments were performed, and on the immediate postoperative period, five animals had good reperfusion. However, on the seventh postoperative day,

histological analysis showed rejection in five animals. **Conclusion:** The experimental model of uterine transplantation is feasible, but monitoring doses of immunosuppressants is pivotal to prevent rejection episodes.

Keywords: Transplantation; Uterus/transplantation; Infertility; Pregnancy; Swine; Models, animal; Immunosuppressive agents; Cyclosporine

INTRODUÇÃO

Os recentes avanços da Medicina Reprodutiva, especialmente em questões tecnológicas, como a estimulação hormonal, fertilização *in vitro* (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI - *intracytoplasmic sperm injection*), tornaram possível a resolução de muitas causas de infertilidade masculina e feminina.⁽¹⁾ Para aquelas mulheres com infertilidade absoluta, as opções tradicionais de maternidade são a adoção ou a gestação de substituição (conhecida como 'barriga de aluguel').⁽²⁾

Entretanto, em muitos países, a gestação de substituição não é aceita por questões legais, éticas e religiosas.⁽³⁾ Assim, mulheres submetidas à histerectomia na juventude por doenças ginecológicas malignas ou benignas, como leiomioma, endometriose e adenomiose; pacientes com perda sanguínea importante após o parto que culminaram com histerectomia; e, por fim, mulheres com anomalias congênitas do trato genital; como a síndrome de Rokitansky-Küster-Hauser-Mayer estão condenadas a não terem filhos. Indiscutivelmente, para

¹ Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil.

² Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

³ Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Autor correspondente: Emerson de Oliveira – Avenida Lauro Gomes, 2.000 – Vila Sacadura Cabral – CEP: 09060-870 – Santo André, SP, Brasil – Tel.: (11) 4993-5400 – E-mail: emerson_oliveira@terra.com.br

Data de submissão: 20/4/2017 – Data de aceite: 15/8/2017

Conflitos de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082017AO4066



muitas mulheres, esta perspectiva afeta muito negativamente sua qualidade de vida.⁽⁴⁻⁷⁾

As várias questões envolvidas em torno da gestação de substituição têm levado estas mulheres a ‘sonharem’ com a possibilidade do transplante uterino, que aliviaria a angústia do enorme desejo de conceberem e gestarem uma criança.⁽⁸⁾

O transplante uterino mimetiza uma situação normal, com os constituintes primários da maternidade genética, gestacional e legal. Além disto, os riscos comuns de saúde associados à gravidez, como tromboembolismo, hipertensão, diabetes e complicações de parto, estariam relacionados a mãe genética, e não a mulher que se submeteu à gestação de substituição.⁽²⁾

Nos últimos anos, vários avanços nas técnicas de transplante de órgãos foram alcançados. Técnicas de anastomose microvascular e as drogas anti-rejeição estão se tornando seguras.⁽⁹⁾ O transplante de órgãos não vitais, como face e mãos, tem sido relatado.⁽¹⁰⁾ No entanto, apesar dos avanços mencionados, o transplante de útero ainda é tema controverso.⁽⁹⁾

Em 2009, o Comitê de Aspectos Éticos de Reprodução Humana e Saúde da Mulher da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) elaborou um documento que estabeleceu as diretrizes para o transplante uterino em humanos. Segundo a FIGO, considerando a prevalência de infertilidade feminina por fator uterino de cerca de 3 a 5%, e as questões que envolvem a gestação de substituição há justificativa, nestas situações específicas, para a realização do transplante.⁽¹¹⁾ Entretanto, qualquer procedimento em humanos só teria justificativa depois de ensaios realizados em modelos animais adequados, que devem incluir primatas, pela analogia das estruturas anatômicas com as da espécie humana.⁽¹¹⁾

OBJETIVO

Avaliar a técnica de transplante uterino e as drogas utilizadas no processo de imunossupressão em modelo animal.

MÉTODOS

Este estudo foi realizado por meio da parceria entre a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), cadastrado e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com o número 2112/08, e o Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEP), cadastrado e aprovado no CEP com o número CEUA 1074-09. No período entre abril de 2009 a abril de 2011, foram realizados seis experimentos (12 cirurgias) no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC) do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). Todas as atividades no

CETEC seguiram os procedimentos éticos e as boas práticas no tratamento e no uso de animais.

Foram incluídas 12 porcas da raça *Large White*, com 8 a 13 meses de idade e peso variando de 30 a 40kg. Foram realizadas provas cruzadas para afastar a possibilidade de incompatibilidade sanguínea dos animais - doadores e receptores.

Procedimentos na doadora e na receptora

O protocolo de anestesia para suínos consiste de jejum sólido e hídrico por cerca de 12 horas. Nas baias, os animais receberam as medicações pré-anestésicas: cloridrato de quetamina em bólus de 10mg/kg associado a midazolam 0,25mg/kg, em aplicação intramuscular profunda na região do glúteo. Após 5 minutos, as porcas foram lavadas com ducha de água para retirar as sujidades do corpo e, em seguida, pesadas e encaminhadas para o centro cirúrgico (Tabela 1).

Tabela 1. Peso de doadoras e receptoras

| Experimento | Peso da doadora (kg) | Peso da receptora (kg) |
|-------------|----------------------|------------------------|
| 1 | 29,6 | 33,5 |
| 2 | 28 | 29 |
| 3 | 30 | 36 |
| 4 | 25 | 28 |
| 5 | 26 | 28 |
| 6 | 27 | 24 |

As veias periféricas dos animais foram puncionadas com Jelco 22, e a indução anestésica foi feita com etomidato (1 a 2mg/kg=15mL). Após o relaxamento e assim que se evidenciou o globo ocular com aspecto rotacional, os animais foram intubados com sonda orotraqueal número 6,5. A anestesia foi mantida com o gás isoflurano 1,5% diluído em 2 litros de oxigênio e com volume corrente de 10mL/kg/hora. Antes de iniciar o procedimento cirúrgico, foram aplicados analgésicos e relaxantes musculares. A analgesia foi realizada com fentanil 2,5mcg/kg, e os relaxantes musculares utilizados foram besilato de cis-atracúrio, na dose de 0,24mg/kg, e pancurônio, na dose de 0,2mg/kg.

Eletrodos e oxímetro foram colocados nos animais para sua monitorização durante todo o procedimento. Foram feitas assepsia e antisepsia na região abdominal e inguinal.

A imunossupressão foi realizada conforme a tabela 2.

Os animais doadores e receptores foram submetidos aos seguintes procedimentos: assepsia da pele com povidine (PVPI) degermante, posicionamento de campos

Tabela 2. Dose administrada de ciclosporina ao dia

| Dia | Evento | Via | Dose (mg/kg/dia) |
|-----|-----------------|-------------|------------------|
| D1 | Transoperatório | Intravenosa | 2 |
| D2 | Transoperatório | Intravenosa | 2 |
| D3 | Pós-operatório | Oral | 5 |
| D4 | Pós-operatório | Oral | 5 |
| D5 | Pós-operatório | Oral | 5 |
| D6 | Pós-operatório | Oral | 5 |
| D7 | Pós-operatório | Oral | 5 |
| D8 | Pós-operatório | Oral | 5 |
| D9 | Pós-operatório | Oral | 5 |
| D10 | Pós-operatório | Oral | 5 |
| D11 | Pós-operatório | Oral | 5 |
| D12 | Pós-operatório | Oral | 5 |
| D13 | Pós-operatório | Oral | 5 |
| D14 | Pós-operatório | Oral | 5 |

cirúrgicos estéreis, incisão mediana xifo-púbica da pele, abertura do tecido subcutâneo e hemostasia, abertura da aponeurose, visualização da cavidade abdominal e inspeção dos órgãos, e dissecação do retroperitônio, até a identificação da aorta e da veia cava inferior.

Na doadora, a seguinte técnica foi empregada: ligadura dos ramos dorsais da artéria aorta com algodão 3.0; dissecação do retroperitônio, até a identificação das artérias ilíacas externas bilateralmente; dissecação do ligamento largo até o isolamento do corno uterino, ligadura do ureter na inserção da bexiga, dissecação caudal da artéria ilíaca interna até a origem da artéria uterina, seguida da ligadura dos vasos ilíacos, do ramo vaginal da artéria ilíaca interna bilateralmente, dos ligamentos vésico-uterinos e vasos uterinos bilateralmente com algodão 2.0, e dos ligamentos infundíbulos pélvicos; preparação de solução com soro fisiológico 0,9% em temperatura ambiente e soro fisiológico 0,9% congelado, mantendo-se a solução 4°C; cateterização da artéria ilíaca externa com sonda vesical de alívio número 14; ligadura da aorta; infusão de solução de Collins pelo cateter da artéria ilíaca externa até a completa limpeza da circulação para o útero; secção da veia cava inferior para o sacrifício do animal; ligadura da artéria ilíaca externa bilateralmente; secção da vagina na altura da cérvice uterina; retirada do útero e sua preservação com soro fisiológico congelado; e fechamento da cavidade do doador com Vicryl-0 em pontos contínuos (Figuras 1 e 2).

A receptora foi submetida à seguinte técnica: reparo dos vasos proximais e distais com o auxílio de algodão 2.0 e apreensão da veia cava inferior, com o auxílio de pinça Satinsky, seguida da secção da mesma. Posteriormente, foi realizada a anastomose término-lateral, com a veia cava do enxerto, que foi suturado com

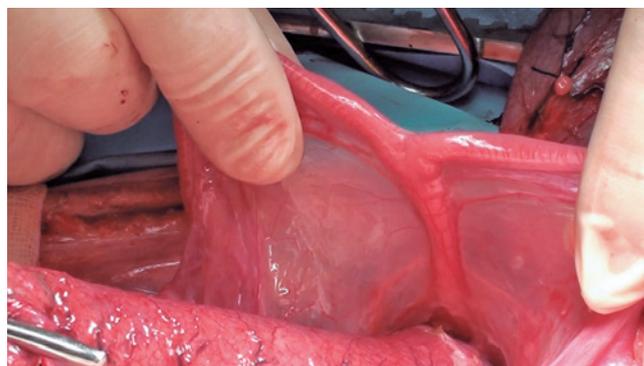


Figura 1. Útero da doadora

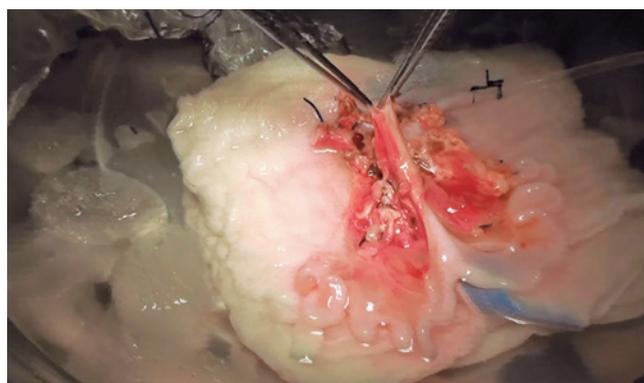


Figura 2. Aspecto final do útero heterotópico transplantado

pontos contínuos de Prolene número 7.0, com o auxílio de *Clamps* do tipo Satinsky. Realizou-se a apreensão da aorta seguida de sua secção, anastomose término-lateral com a aorta do enxerto e sutura com pontos contínuos de Prolene número 7.0. Foram feitas ainda reperfusão do enxerto e revisão hemostática, sendo realizada anastomose da cavidade vaginal do doador com o receptor com pontos de Vicryl 4.0, síntese da aponeurose com Vicryl 1 e síntese da pele com Vicryl 1 em pontos separados (Tabela 3 e Figura 3).



Figura 3. Aspecto final do útero heterotópico transplantado

Tabela 3. Controle da cirurgia na receptora

| Experimento | Início da anestesia | Início da cirurgia | Clampeamento | Início da anastomose | Reperusão | Heparinização | Final do procedimento |
|-------------|---------------------|--------------------|--------------|----------------------|-----------|---------------|-----------------------|
| 1 | 12h40 | 12h50 | 13h | 13h05 | 13h45 | 13h45 | 14h15 |
| 2 | 13h20 | 13h35 | 14h | 14h05 | 15h10 | 15h10 | 16h30 |
| 3 | 13h40 | 13h50 | 14h | 14h05 | 14h45 | 14h45 | 15h15 |
| 4 | 11h40 | 11h50 | 12h | 12h05 | 12h45 | 12h45 | 13h15 |
| 5 | 12h | 12h24 | 13h | 13h05 | 13h45 | 13h45 | 14h50 |
| 6 | 12h40 | 12h50 | 13h | 13h05 | 13h45 | 13h45 | 14h15 |

RESULTADOS

Após a reanastomose, a vitalidade do enxerto (reperusão) foi avaliada. Em cinco receptoras, excetuando-se o animal do quarto experimento, as receptoras foram acompanhadas diariamente por 7 dias. No sétimo dia de pós-operatório, os cinco animais foram encaminhados para a realização de laparotomia, que seguiu os mesmos cuidados anestésicos já descritos. Após a abertura da cavidade, foi constatada necrose do útero implantado. Nesse momento, foram realizadas a coleta do órgão implantado e a eutanásia dos animais, que foram encaminhados para o *freezer* para posterior incineração. No animal do quarto experimento, após a reanastomose, observou-se ausência de vitalidade do enxerto (pobre reperusão). Nesse momento, foram realizadas a coleta do órgão implantado e a eutanásia do animal, que foi encaminhado para o *freezer* para posterior incineração.

Foram realizadas avaliações histológicas dos úteros implantados. No primeiro experimento, foi demonstrada necrose por provável componente mecânico e ausência de sinais de rejeição. Nos segundo, terceiro, quinto e sexto experimentos, evidenciou-se necrose por rejeição aguda (presença de infiltrado inflamatório com agressão glandular e capilarite, principalmente por neutrófilos). Necrose por rejeição hiperaguda (presença de infiltrado inflamatório com extrema agressão glandular e capilarite, principalmente por neutrófilos) foi observada no animal do quarto experimento (Quadro 1).

Quadro 1. Aspecto histológico do útero

| Experimento | Vitalidade do enxerto | Aspecto histológico |
|-------------|-----------------------|----------------------|
| 1 | Excelente | Ausência de rejeição |
| 2 | Excelente | Rejeição aguda |
| 3 | Excelente | Rejeição aguda |
| 4 | Ausente | Rejeição hiperaguda |
| 5 | Excelente | Rejeição aguda |
| 6 | Excelente | Rejeição aguda |

DISCUSSÃO

Em 2000, na Arábia Saudita, foi realizado o primeiro transplante uterino humano. Porém, o útero transplantado permaneceu na receptora por 99 dias, ocasião em que ocorreu oclusão dos vasos uterinos por trombose.⁽⁸⁾ Na Turquia, em 2011, uma paciente de 21 anos que nascera sem útero recebeu o primeiro transplante de útero de uma doadora morta. Os resultados preliminares deste procedimento foram publicados em 2013 e não demonstraram rejeição ao enxerto.⁽¹²⁾

O grupo sueco do Dr. Mats Brännström tem uma linha de pesquisa que envolve transplantes uterinos em doadoras vivas. Este grupo realizou nove transplantes uterinos e não relatou quaisquer complicações imediatas no pós-operatório. Registrou-se que, após 6 meses, sete pacientes se encontravam com o enxerto viável, e duas os perderam devido a fenômenos trombóticos.⁽¹³⁾ O grupo considera que, diferentemente de qualquer outro transplante, o enxerto uterino é efêmero, isto é, ele é retirado tão logo se alcance o resultado almejado, ou seja, uma ou duas gestações saudáveis. Assim, a imunossupressão é feita por um período de tempo limitado. Em seus estudos em modelos animais, os membros do grupo garantem que o procedimento é compatível com gestações plenamente normais, em que pese a utilização de imunossupressão.⁽¹³⁾

Em nossa pesquisa, utilizamos uma dosagem mínima de ciclosporina, e provavelmente isto levou a uma grande frequência de rejeição. Ademais, não realizamos o controle dos níveis séricos de imunossupressor, o que pode ter tido contribuição negativa expressiva neste aspecto. Nossos resultados diferem do projeto de Avison et al., que descreveu o primeiro modelo de transplante uterino em suínos e concluiu que tal modelo é passível de execução em transplantes heterotópicos.⁽¹⁴⁾ A imunossupressão foi realizada com tacrolimo por via intravenosa durante os primeiros 12 dias pós-transplante, seguida de imunossupressão de manutenção com ciclosporina oral. As rejeições agudas do enxerto apresentadas durante o segundo e terceiro mês pós-transplante foram tratadas com sucesso com o aumento da imunossupressão de manutenção e esteroides.⁽¹⁴⁾

Diferentemente de outros órgãos supridos por vasos calibrosos, o útero recebe irrigação de uma rede de finos vasos. Isto significa que estabelecer um fluxo sanguíneo para o órgão transplantado é extremamente complexo e propenso a problemas. Iniciamos nosso projeto com um modelo em coelhos, entretanto, logo nos primeiros procedimentos, constatamos a necessidade da mudança do modelo animal. Os coelhos são animais estressados, frágeis e com vasos sanguíneos muito diminutos; optamos, assim, por trabalhar com um modelo em suínos. Adicionalmente, os vasos sanguíneos que suprem o útero devem ser capazes de se expandirem até três vezes durante a gestação, para suportar o desenvolvimento do feto.

CONCLUSÃO

Indiscutivelmente, nosso trabalho é de execução árdua e complexa. No Brasil, é pioneiro. Tivemos êxito no estabelecimento da técnica operatória, mas verificamos ser necessários observação rigorosa e controle dos níveis de imunossupressor. Nossos resultados sugerem que drogas mais modernas devem ser usadas no processo de imunossupressão. As pesquisas devem prosseguir, para que haja evolução neste campo fascinante do conhecimento, que pode melhorar a qualidade de vida de muitas mulheres.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro com o número do processo 2008/09441-1.

REFERÊNCIAS

1. Campagne DM. Should fertilization treatment start with reducing stress? *Hum Reprod.* 2006;21(7):1651-8. Review.
2. Dahm-Kähler P, Diaz-Garcia C, Brännström M. Human uterus transplantation in focus. *Br Med Bull.* 2016;117(1):69-78. Review.
3. Nakash A, Herdman J. Surrogacy. *J Obstet Gynaecol.* 2007;27(3):246-51. Review.
4. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Beller U, Benedet JL, et al. Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynecol Obstet.* 2006;95(Suppl 1):S105-43.
5. Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RL, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, et al. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol.* 1997;90(6):967-73.
6. Saravelous SH, Cocksedge KA, Li TC. Prevalence and diagnosis of congenital uterine anomalies in women with reproductive failure: a critical appraisal. *Hum Reprod Update.* 2008;14(5):415-29. Review.
7. Bryan AL, Nigro JA, Counseller VS. One hundred cases of congenital absence of the vagina. *Surg Gynecol Obstet.* 1949;88(1):79-86.
8. Fageeh W, Raffa H, Jabbar H, Marzouki A. Transplantation of the human uterus. *Int J Gynaecol Obstet.* 2002;76(3):245-51.
9. Kisu I, Mihara M, Banno K, Hara H, Yamamoto T, Araki J, et al. A new surgical technique of uterine auto-transplantation in cynomolgus monkey: preliminary report about two cases. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285(1):129-37.
10. Devauchelle B, Badet L, Lengelé B, Morelon AND, Testelin S, Michallet M, et al. First human face allograft: early report. *Lancet.* 2006;368(9531):203-9.
11. Brain drain of healthcare workers: FIGO Committee for the Ethical Aspects of Human Reproduction and Women's Health. *Int J Gynaecol Obstet.* 2010;108(2):174-5.
12. Ozkan O, Akar ME, Ozkan O, Erdogan O, Hadimioglu N, Yilmaz M, et al. Preliminary results of the first human uterus transplantation from a multiorgan donor. *Fertil Steril.* 2013;99(2):470-6.
13. Brännström M, Johannesson L, Dahm-Kähler P, Enskog A, Mölne J, Kvarnström N, et al. First clinical uterus transplantation trial: a six-month report. *Fertil Steril.* 2014;101(5):1228-36.
14. Avison DL, DeFaria W, Tryphonopoulos P, Tekin A, Attia GR, Takahashi H, et al. Heterotopic uterus transplantation in a swine model. *Transplantation.* 2009;88(4):465-9.