

ALESSANDRO WASUM MARIANI

**Preservação pulmonar com ECMO-tópico ou
isquemia fria: avaliação funcional *ex vivo* e
histológica de pulmões não aceitos para
transplante pulmonar**

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

Programa de: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo
Fernandes

SÃO PAULO

2012

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Acrônimos

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	5
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1 Histórico do Desenvolvimento dos Transplantes.....	6
3.2 Técnicas de Preservação Pulmonar.....	11
3.3 Soluções de Preservação Pulmonar.....	15
3.4 Outras Considerações Sobre a Preservação Pulmonar.....	19
3.4.1 Fármacos	19
3.4.2 Temperatura.....	20
3.4.3 Grau de Insuflação Pulmonar.....	21
3.4.4 Fração de Oxigênio.....	21
3.5 O Desenvolvimento do Modelo <i>Ex Vivo</i>	22
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 Delineamento do Estudo.....	29
4.2 Processo de Obtenção dos Órgãos.....	32
4.3 Procedimentos.....	33
4.3.1 Captação Pulmonar e Transporte.....	33
4.3.2 Preservação: ECMO-tópico ou Isquemia Fria.....	35
4.3.3 Modelo <i>Ex Vivo</i> Modificado Para o Estudo.....	37
4.4 Variáveis do Estudo.....	42
4.4.1 Avaliação Hemodinâmica	42

4.4.2 Avaliação Funcional	42
4.4.3 Variação do Peso	43
4.4.4 Razão Peso Úmido-Peso Seco	43
4.4.5 Avaliação Histológica.....	43
4.5 Análise Estatística.....	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Avaliação Funcional.....	56
5.2 Avaliação Hemodinâmica.....	59
5.3 Variação de Peso.....	60
5.4 Razão Peso Úmido-Peso Seco	62
5.5 Avaliação Histológica	63
5.5.1 Microscopia Ótica.....	63
5.5.2 Contagem de Células Apoptóticas (TUNEL).....	65
5.5.3 Avaliação do Infiltrado de Células CD3+.....	66
5.5.4 Microscopia Eletrônica	68
6 DISCUSSÃO	69
6.1 Casuística	69
6.2 Avaliação Funcional	71
6.3 Variação de Peso e Razão Peso Úmido-Peso Seco	73
6.4 Avaliação Histológica.....	74
6.5 Limitações	77
6.6 Conclusões.....	78
6.6.1 O Sistema <i>Ex Vivo</i>	78
6.6.2 Modelo Pulmão Dividido	78

6.6.3 ECMO-tópico X Isquemia Fria	78
7 REFERÊNCIAS.....	80

Resumo

Mariani AW. *Preservação pulmonar com ECMO-tópico ou isquemia fria. Avaliação funcional ex vivo e histológica de pulmões não aceitos para transplante pulmonar.* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução: Apesar dos importantes avanços na preservação pulmonar alcançados nas últimas décadas esta questão permanece longe do ideal e representa um dos maiores problemas enfrentados pelos grupos de transplante pulmonar. O grupo da Suécia liderado pelo Prof. Stig Steen descreveu um novo método de preservação pulmonar chamado de ECMO-tópico que foi publicado nos mesmos artigos que divulgaram o sistema de perfusão *ex vivo*. Todavia, este novo método nunca foi avaliado de forma comparativa contra a forma atualmente mais aceita de preservação pulmonar: a isquemia fria após infusão de solução de preservação. O presente estudo compara estas duas formas de preservação utilizando um modelo de avaliação pulmonar *ex vivo*. Como objetivos secundários foram estudados: a capacidade de recuperação da função pulmonar pelo sistema *ex vivo* e a utilidade do modelo experimental “bloco pulmonar dividido”. **Métodos:** Quatorze pulmões foram captados de sete doadores em morte encefálica negados para transplante pulmonar. Após a preservação inicial com perfusão anterógrada de solução de LPD-glicose o bloco pulmonar foi dividido, sendo cada lado submetido a um método diferente de preservação: ECMO-tópico ou isquemia fria por oito horas. Após este período os pulmões foram re-conectados e avaliados em um sistema de reperfusão pulmonar *ex vivo* estudando-se parâmetros funcionais e histológicos; biópsias pulmonares foram coletadas em três tempos em cada lado. As variáveis funcionais estudadas foram: capacidade de oxigenação (CO), pressão de artéria pulmonar (PAP) e resistência vascular pulmonar (RVP). As variáveis histológicas foram: escore de lesão pulmonar (ELP), contagem de células apoptóticas (CCA) e estudo de microscopia eletrônica de transmissão. **Resultados:** Sete casos foram incluídos. A idade média foi de 53.86 anos (± 16.7); sexo masculino em 4 casos (57.1%); causa da morte encefálica: acidente vascular encefálico hemorrágico em 5 doadores e trauma crânio encefálico em 2. O lado submetido ao ECMO-tópico: direito em 4 e esquerdo em 3 casos. A média da CO foi 468.00 mmHg (± 81.69) no grupo ECMO-tópico e 455.86 (± 54.05) no grupo isquemia fria ($p=0.758$); a mediana da PAP foi de 140 mmHg_(120 – 160) para o ECMO-tópico e 140mmHg_(140 – 150) para isquemia fria ($p=0,285$); a mediana da RVP 459 dina.s.cm-5_(432,43 – 492,30) no grupo ECMO-tópico e 474,5 dina.s.cm-5_(459,01 – 545,45) no grupo isquemia fria ($p=0,285$). As médias dos escores de lesão pulmonar encontrados foram: para o grupo ECMO-tópico em T1 6,285 ($\pm 4,029$), em T2 8,714 ($\pm 7,714$) e em T3 9,571 ($\pm 7,857$); já no grupo isquemia fria as médias foram em T1 7,571 ($\pm 4,429$), em T2 7,714 ($\pm 4,785$) e em T3 7,857

($\pm 6,121$) $p = 0,531$. As médias das contagens de células apoptóticas foram: para o grupo ECMO-tópico em T1 16,71($\pm 2,545$), em T2 20,71 ($\pm 5,843$) e em T3 25,00 ($\pm 9,34$); no grupo isquemia fria em T1 18,57 ($\pm 5,118$), em T2 17,57 ($\pm 3,014$) e em T3 24,86 ($\pm 10,374$) $p=0,803$. O estudo de microscopia eletrônica de transmissão não demonstrou diferenças entre os grupos. Conclusões: Neste estudo o ECMO-tópico não demonstrou melhora na preservação pulmonar, comparado a isquemia fria, em nenhum dos parâmetros estudados. O modelo de reperfusão pulmonar *ex vivo* permitiu importante melhora na função pulmonar, e o modelo experimental com bloco pulmonar dividido demonstrou ser um método adequado para estudos experimentais comparativos com pulmões humanos.

Descritores: Transplante de Pulmão, Preservação de Órgãos, Soluções para Preservação de Órgãos.

Summary

Mariani AW. *Lung Preservation: topical-ECMO or cold ischemia. Functional ex vivo and histological evaluation of donated lungs refused for lung transplantation*. [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

Background: Besides the important advances in lung preservation reached in last decades this subject continues far from ideal and still represent a major challenge for the lung transplant groups. The Swedish group lead by Prof. Stig Steen has described a new method of preservation so called topical-ECMO along with the *ex vivo* perfusion system. However this new method has never been tested against the most popular formula of preservation: cold ischemia after single flush perfusion. This study compares these two forms of lung preservation on an *ex vivo* evaluation model. As secondary's end-points we also study the *ex vivo* lung perfusion capacity for recover damaged lungs to transplant and the usefulness of the lung bloc split model for experimental study of human lungs. Methods: Fourteen lungs were retrieved from seven brain-dead organ donors refused for transplantation. After initial preservation with single flush of LPD glucose, the lung bloc was divided and each side was preserved by topical-ECMO or cold ischemia for 8 hours. After this the bloc was reconnected than assessed on *ex vivo* lung system for functional and histological parameters; lung biopsies were collect in three different times on each side. The functional variables assessed were: oxygenation capacity (OC), pulmonary artery pressure (PAP) and pulmonary vascular resistance (PVR). The histological variables were: lung injury score (LIS), apoptotic cells counting and transmission electron microscopy study. Results: Seven cases were included. Mean age 53.86 years (± 16.7); male 4 (57.1%); cause of death: hemorrhagic stroke for 5 donors and head trauma for 2. Side of topical-ECMO: Right 4 e Left 3. The mean OC was 468.00 mmHg (± 81.69) on topical-ECMO group and 455.86 (± 54.05) on Cold Ischemia group ($p=0.758$); median PAP median was 140 mmHg_(120 – 160) for topical-ECMO and 140mmHg_(140 – 150) for Cold Ischemia ($p=0.285$); median PVR 459 dina.s.cm-5_(432,43 – 492,30) on topical-ECMO group and 474,5 dina.s.cm-5_(459,01 – 545,45) on Cold Ischemia group ($p=0.285$). The median for LIS was: topical-ECMO group on T1 6,285 ($\pm 4,029$), on T2 8,714 ($\pm 7,714$) and on T3 9,571 ($\pm 7,857$); Cold Ischemia group on T1 7,571 ($\pm 4,429$) on T2 7,714 ($\pm 4,785$) and on T3 7,857 ($\pm 6,121$) $p=0.531$. For apoptotic cell counting: topical-ECMO group on T1 16,71($\pm 2,545$), on T2 20,71 ($\pm 5,843$) and on T3 25,00 ($\pm 9,34$); for Cold Ischemia group it was on T1 18,57 ($\pm 5,118$), on T2 17,57 ($\pm 3,014$) and on T3 24,86 ($\pm 10,374$) $p=0.803$. The transmission electron microscopy study shows no difference between groups. Conclusions: In our study the topical-ECMO failed to show improvement of lung preservation compared with the cold ischemia in all studied parameters. However the *ex vivo* lung perfusion model was responsible for a important increase on lung

function, and the lung bloc split model appears as a reliable method for experimental human lung studies.

Descriptors: Lung Transplantation, Organ Preservation, Organ Preservation Solutions

1 INTRODUÇÃO

O transplante pulmonar corresponde hoje a uma terapêutica bem estabelecida para diversas doenças pulmonares em estágios avançados. Este grupo heterogêneo de enfermidades, também conhecido como pneumopatias terminais, congrega doenças altamente incapacitantes e que possuem letalidade elevada, a despeito do considerável avanço nos tratamentos farmacológicos disponíveis. O número de pacientes portadores é expressivo, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento.

Foi nesse contexto que o transplante de pulmão evoluiu, em pouco mais de 30 anos, de uma técnica experimental, para se firmar como a melhor opção de tratamento para diversos pacientes portadores de pneumopatias terminais. Esta informação sustenta-se no considerável crescimento do número de procedimentos realizados anualmente. Segundo dados atualizados do registro da *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) no ano de 2009 foram realizados 3.272 procedimentos em todo o mundo, contra 204 realizados no ano de 1989 e 1.559 realizados em 1999¹. Outra característica importante é a melhora expressiva da sobrevida em relação aos primeiros anos do desenvolvimento do transplante pulmonar. Atualmente a média global de sobrevida é de 5,3 anos, sendo que a curva de atuarial do grupo de transplante do InCor HCFMUSP com 85 pacientes (2003-2008) indica uma probabilidade de 63,15% de sobrevida em cinco anos².

Atualmente, a maior limitação apontada pelos diversos grupos ao desenvolvimento do transplante pulmonar é o baixo número de doadores viáveis para transplante. Esta condição faz com que a fila de espera seja longa, o que incorre em importante mortalidade em lista³. Diferentemente do que ocorre para outros órgãos sólidos, como fígado e rim, a maior limitação não é o número total de doadores e sim a viabilidade destes doadores. Encontramos na literatura taxas médias de aproveitamento de pulmões para transplante próximas a 15% (6,1-27,1%), entre todos os doadores de órgãos e tecidos⁴. Em nosso país esta realidade é ainda pior, um trabalho realizado em 2006 com os dados da Central de Transplantes do Estado de São Paulo demonstrou que o índice de doadores utilizados para transplante pulmonar foi de apenas 4,9% dentre todos os ofertados⁵.

Diversas medidas foram propostas para o aumento do número de doadores efetivos, dentre elas vale destacar: intensificação das campanhas de doação, transplante inter-vivos, o uso de doadores com coração parado e a maior flexibilidade dos critérios para aceitação de doadores de pulmão⁶.

A baixa tolerância do pulmão a isquemia corresponde a outra importante questão, tanto por ser causa de complicações pós-operatórias imediatas, quanto tardias⁷. Essa característica faz com que o órgão uma vez captado tenha que ser implantado em um espaço de tempo relativamente curto, limitando a distância de captação entre o local do doador e o local do receptor. No intuito de aumentar o tempo tolerado bem como minimizar os efeitos deletérios da isquemia diversos estudos no campo da preservação pulmonar foram realizados⁸.

Atualmente a preservação mais utilizada no mundo é a perfusão anterógrada com solução de preservação extra-celular gelada a 4°C⁹. Dentre as soluções extra-celulares o Perfadex (VitroLife AB, Gotemburgo, Suécia) e o Celsior (SangStat, Lyon, França) são as mais difundidas entre os centros transplantadores^{10,11}.

O grupo de pesquisa sueco da Universidade de Lund liderado pelo Prof. Stig Steen, durante seus estudos para a utilização de doadores com coração parado, desenvolveu um modelo de avaliação pulmonar *ex vivo* composto de um circuito de circulação extracorpórea modificado e preenchido com uma solução de reperfusão especialmente desenvolvida para esta finalidade, denominada *Steen Solution®* (VitroLife AB, Gotemburgo, Suécia), associados com ventilador mecânico e monitores de pressão¹². Com o aprimoramento destes estudos, no que concerne a reperfusão pulmonar, este grupo descobriu a possibilidade de utilização desse sistema para avaliação e condicionamento de pulmões de doadores inicialmente descartados para transplante, abrindo uma nova era de pesquisas para o transplante pulmonar¹³.

Junto a este sistema o grupo do Prof. Steen agregou sua experiência com estudos sobre a preservação pulmonar por resfriamento tópico desenvolvendo, simultaneamente ao modelo *ex vivo*, uma nova estratégia de preservação pulmonar ao qual ele denominou de “topical ECMO” (extra-corporeal membrane oxygenation), aqui chamado de ECMO-tópico¹⁴.

O sistema para preservação pulmonar por ECMO-tópico desenvolvido no grupo sueco consiste em: preencher com *Steen Solution®* a caixa de

contenção do pulmão, conectar esta caixa ao circuito de extracorpórea para contínua recirculação da solução. Nesse perfusato enriquecido com oxigênio e mantido a uma temperatura de 8°C o pulmão é imerso em um estado semi insuflado¹⁵. Quando for necessário aumentar o volume de solução, para permitir a completa imersão do órgão, quantidades variáveis de Perfadex® podem ser adicionadas.

O ECMO-tópico apesar de utilizado tanto experimentalmente quanto na prática clínica pelo grupo do Prof. Steen, nunca foi estudado comparativamente em relação a forma atualmente preconizada e mais aceita de preservação: a isquemia fria após perfusão anterógrada com solução de preservação extra-celular gelada a 4°C.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal desse estudo foi a avaliação comparativa funcional e histológica de pulmões retirados de doadores não aceitos para transplante pulmonar submetidos a preservação com a técnica do ECMO-tópico versus isquemia fria.

Como objetivos secundários estudamos:

- A capacidade do modelo *ex vivo* em aumentar a capacidade de oxigenação dos pulmões não aceitos para transplante pulmonar;
- A adequação do modelo experimental com “bloco pulmonar dividido” em associação com a reperfusão *ex vivo* para estudo de preservação pulmonar.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HISTÓRICO DO DESENVOLVIMENTO DOS TRANSPLANTES

Diversos relatos históricos demonstram que a humanidade desde a antiguidade já considerava a idéia da remoção de um tecido para substituição de outro, seja de um mesmo indivíduo ou para indivíduos diferentes¹⁶. Os textos mais antigos são os Hindus datados de 2500–3000 AC que descreviam a utilização de retalhos cutâneos para a reconstrução de narizes mutilados¹⁷.

A Bíblia faz alusão a um episódio onde Jesus recupera a orelha de um servo que foi perdida em batalha e a outro onde São Pedro reimplantou os seios de Santa Ágata. Todavia, a lenda que mais se assemelha ao que entendemos hoje como transplante está descrita no texto da “Legenda Áurea” de Jacopo de Varazze (348 AD), o conto do “milagre da perna negra” descreve a reposição de uma perna gangrenosa de diácono romano Justiniano pela perna de um egípcio morto, realizada pelos Santos Cosmo e Damião¹⁸ (Figura 1).



Figura 1. Reprodução da Pintura de Pedro Berruguete (XV D.C.) ilustrando a cena da lenda do “Milagre da Perna Negra”.

O transplante de dentes entre pessoas está descrito em diversos períodos da história desde o antigo Egito, Grécia e Roma até os séculos dezesseis e dezessete em países da Europa ocidental como França e Escócia. Outro episódio interessante foi a descrição por um Holandês Job van Meeneren do uso bem sucedido de um osso de crânio canino utilizado como enxerto em um paciente com defeito craniano em 1668¹⁸.

Obviamente estas descrições não representam ligação direta com a evolução dos modernos transplantes de órgãos da atualidade, mas exemplificam muito bem a inquietude e procura humana por tratamentos que possam melhorar a longevidade, bem como a qualidade de vida.

Os primeiros estudos experimentais demonstrando a viabilidade técnica para a realização de transplantes datam do início do século. Dentre esses autores o mais notório foi o cirurgião Alexis Carrel que recebeu em 1912 um

Prêmio Nobel por seus estudos^{19,20} que serviriam de base para o desenvolvimento da ciência relacionada com transplantes de órgãos sólidos.

Apesar do interesse da comunidade médico-científica a era dos transplantes só começou a se concretizar na década de 1950. Os primeiros transplantes bem-sucedidos em humanos foram: rim ocorrido em 1954 na cidade de Boston, Estados Unidos, quando um rim foi transferido do corpo de um homem para seu irmão gêmeo²¹; fígado realizado pela equipe do Dr. Thomas Starzl de Denver nos Estados Unidos que realizaram diversos procedimentos sem sucesso, desde 1963, até o primeiro bem sucedido de 1967²²; coração em 3 de dezembro de 1967 na Cidade do Cabo tendo como responsável o cirurgião sul-africano Christiaan Neethling Barnard²³.

A história do transplante de pulmão começa com Vladimir Demikhov²⁴ que realizou na Rússia os primeiros transplantes pulmonares em animais na década de 1940. Na França em 1950, o francês Henri Metras²⁵ também desenvolveu estudos sobre a viabilidade do transplante pulmonar, experiência essa realizada através do alotransplante pulmonar unilateral em cães. Algumas técnicas desenvolvidas por ele são utilizadas até hoje, como o implante das veias pulmonares em conjunto por meio de um *cuff* atrial, suturado diretamente no átrio do receptor.

Em junho de 1963 o Dr. James Hardy²⁶ e sua equipe na Universidade do Mississippi, realizaram o primeiro transplante pulmonar unilateral em um paciente de 58 anos portador de enfisema pulmonar e câncer de pulmão. Apesar da baixa sobrevida do receptor, apenas 18 dias e falecendo por insuficiência renal, a melhora significativa da função pulmonar obtida nos primeiros dias do pós-operatório, demonstrou tanto a viabilidade técnica do

transplante pulmonar, quanto a boa capacidade funcional do enxerto após o implante.

Nas duas décadas seguintes registraram-se aproximadamente 40 tentativas de transplante pulmonar, sendo que em todos os casos os resultados foram ruins com sobrevida não superior a algumas semanas. Os problemas encontrados foram infecção, rejeição aguda ou complicações associadas à anastomose brônquica.

Devido a estes resultados adversos o incentivo ao desenvolvimento do transplante pulmonar parecia ameaçado. Todavia, o aparecimento de uma droga iria revolucionar a história dos transplantes de forma definitiva.

A ciclosporina, droga isolada do fungo *Tolypocladium inflatum*, teve seu efeito imunodepressor descoberto em 1972 por pesquisadores suíços liderados pelo Dr. Hartmann F. Stähelin. A ciclosporina tornou-se disponível em 1979, e o seu primeiro uso na prevenção da rejeição de órgãos transplantados ocorreu em 1980 em um transplante de fígado realizado pelo doutor Thomas Starzl em Pittsburgh. O uso da Ciclosporina foi aprovado em 1983²⁷.

Em 1983, após uma série de trabalhos experimentais, o grupo de Toronto liderado pelo Dr. Joel Cooper²⁸ realizou o primeiro transplante pulmonar unilateral da chamada “era da ciclosporina”. O receptor foi um paciente de 53 anos com fibrose pulmonar idiopática com uma sobrevida de seis anos. O mesmo grupo, em 1989, realizou o primeiro transplante pulmonar bilateral seqüencial, que se tornou o procedimento de escolha para as doenças supurativas.

Conforme citado anteriormente os dados do registro ISHLT demonstram claramente a escalada de desenvolvimento do transplante pulmonar no mundo. Este registro mundial sobre a realização dos transplantes pulmonares é mantido desde 1983, sendo coletados dados a respeito de números de procedimentos realizados, bem como seus resultados. Atualmente 223 centros em 18 países submetem seus dados a este registro¹.

No Brasil o primeiro transplante foi realizado em 1989 pelo grupo do Dr. José de Jesus Camargo Peixoto na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Em 1990 O Prof. Vicente Forte realizou o primeiro transplante no estado de São Paulo. No mesmo ano foi iniciada experiência do Grupo InCor HCFMUSP com a realização de seu primeiro caso de transplante pulmonar unilateral. A década de noventa no Brasil foi marcada pelo aparecimento de alguns grupos de transplante pulmonar, todavia, devido a fatores econômicos associados a resultados irregulares, a maior parte destes grupos limitaram suas experiências a poucos casos, fechando seus programas²⁹. Todavia, dados do Registro Brasileiro de Transplantes (RBT) mantido pela Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) demonstram que nos últimos anos existe um aumento progressivo e sustentado no número de transplantes de pulmão. Revendo os dados do RBT verificamos a seguinte escalada em 1998 apenas 10 transplantes de pulmão foram realizados no Brasil, em 2001 foram realizados 23; em 2004 um total de 46; em 2008 um total 53, chegando aos 60 procedimentos em 2010³⁰.

3.2 TÉCNICAS DE PRESERVAÇÃO PULMONAR

A Disfunção Primária do Enxerto (DPE) caracteriza-se como uma síndrome que ocorre nas primeiras 72 horas após o transplante com hipoxemia, infiltrado pulmonar na radiografia de tórax, redução da complacência, aumento da resistência vascular pulmonar e dano alveolar difuso na análise histológica. Sua importância reside tanto na sua frequência, ocorrendo entre 11% a 25% dos transplantados, quanto na sua gravidade, sendo apontada como causa direta de 30% de mortalidade nos primeiros 30 dias pós-transplante^{31,32}.

A gênese da DPE é multifatorial, todas as agressões sofridas pelo pulmão, tanto as iniciadas no período pré-captção (lesão pela ventilação mecânica, ocorrência de pneumonia ou broncoaspiração, trauma torácico, múltiplas hemotransfusões, instabilidade hemodinâmica, entre outros), como as ocorridas no período de isquemia e pós-operatório imediato, estão fortemente relacionadas com sua manifestação³³. Todavia, a lesão de isquemia-reperfusão (LIR) é considerada como a causa mais relevante na origem da DPE³⁴.

O período de isquemia fria é responsável pela inativação da bomba de sódio e potássio, formação de radicais livres de oxigênio, sobrecarga intracelular de cálcio e morte celular³⁵. A LIR inicia-se no momento da reperfusão pela ativação de moléculas de adesão de superfície celular (selectinas, integrinas), disparando uma cascata pró-inflamatória com liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-12, IL-18), metabólitos do ácido aracdônico (tromboxanos, leucotrienos, prostaglandinas) e fator de ativação plaquetária.

O objetivo da preservação pulmonar é minimizar os efeitos deletérios da isquemia no pulmão a ser transplantado, mantendo a sua integridade morfológica e funcional para, em última análise, prevenir a ocorrência da DPE.

Os primeiros trabalhos experimentais demonstraram que os períodos superiores a 90 minutos de isquemia quente são mal tolerados pelos pulmões. Por isso os primeiros transplantes pulmonares em humanos foram realizados com o mínimo de tempo de isquemia, através da realização dos procedimentos no receptor e doador em salas vizinhas³⁶. Todavia, na maioria das vezes o doador e o receptor não se encontram no mesmo hospital e a transferência do doadores relaciona-se com diversos problemas como: risco de deterioração do quadro do doador, não aceitação por parte da família da transferência do corpo, além das dificuldades logísticas do transporte. Tudo isso serviu de estímulo para o desenvolvimento de técnicas de preservação que pudessem aumentar a tolerância dos pulmões a maiores períodos de isquemia.

Os estudos de preservação pulmonar desenvolveram quatro diferentes técnicas, sendo que, a redução do metabolismo celular pela hipotermia é a pedra angular de três dos quatro dos métodos abaixo exemplificados.

O resfriamento tópico do pulmão foi o primeiro método de preservação utilizado na prática clínica com bons resultados. A sustentação teórica de seu emprego embasava-se em estudos experimentais prévios, que mostravam que o resfriamento dos pulmões isquêmicos resultava em melhor função pulmonar após o transplante³⁷. A técnica consiste na simples imersão do pulmão em solução gelada. Esta foi a técnica empregada pelo grupo de

Toronto em sua primeira série publicada de transplantes bem sucedidos no fim da década de oitenta²⁸. Acredita-se que o resfriamento tópico permite que o órgão suporte até 5 horas de isquemia, com regular função no pós-transplante. Atualmente não se sabe de nenhum grupo que a utilize de forma isolada na prática clínica.

Em 1960 Robicsek, adaptando técnicas descritas em estudos de fisiologia publicados em 1985 por Martin e por Starling em 1920, desenvolveu a denominada autoperfusão normotérmica do bloco coração-pulmão para ser usada como um método de preservação no transplante cardíaco³⁷. O grupo de Pittsburgh foi o único a utilizá-lo em seu programa de transplante cardio-pulmonar. Isto porque, apesar dos bons resultados, esta técnica de logística e realização complexas não demonstrou melhores resultados para períodos de isquemia superiores a 6 horas³⁸. Verificou-se que a hipertensão pulmonar ocorria quando o tempo de perfusão atingia 4 ou 6 horas o que acabava por determinar a falência do enxerto. Atualmente nenhum grupo utiliza este método na prática clínica.

O grupo de transplante cardio-pulmonar do Harefield Hospital na Inglaterra desenvolveu um método de preservação que consiste no resfriamento do doador por meio da instalação da circulação extracorpórea (CEC). Esta técnica utilizada por alguns grupos foi progressivamente abandonada devido a sua complexidade e não aumento efetivo ou melhora da preservação, uma vez que apenas 4 horas de isquemia com preservação pulmonar satisfatória foram obtidos para a maioria dos casos³⁹.

Atualmente o método mais difundido e utilizado é a perfusão anterógrada da artéria pulmonar. Descrita pela primeira vez por White et al.* em 1966 *apud* Egan³⁶. Diversos trabalhos como os de Collins et al.⁴⁰ e Sack et al.⁴¹, demonstraram que o método de preservação baseado na perfusão do órgão era capaz de proteger rins da injúria de isquemia por até 72 horas. Apoiados por essas evidências, e por seus próprios trabalhos experimentais, o grupo de Stanford utilizou no início da década de 1980 a perfusão da artéria pulmonar com a solução de Euro-Collins no seu Programa de Transplante Coração-Pulmão com bons resultados⁴².

Esta técnica possui a grande vantagem de ser simples, pois, consiste na infusão de aproximadamente 60 ml/kg de uma solução de preservação a 4 °C através da artéria pulmonar permitindo um resfriamento rápido, eficiente e uniforme dos pulmões. Locke et al. concluíram, após trabalho experimental comparativo em cães submetidos a transplante pulmonar unilateral com 6 horas de isquemia, que a técnica de perfusão da artéria pulmonar com Euro-Collins é superior ao resfriamento tópico, resultando em melhor desempenho pulmonar, avaliado pela melhor capacidade de oxigenação e menor formação de edema⁴³.

Esta é a técnica de preservação que, associada a manutenção do órgão imerso em solução gelada, passou a adotada por quase todas equipes transplantadoras no mundo incluindo o Grupo de Transplante Pulmonar InCor HCFMUSP.

* White JJ, Tanser PH, Anthonisen NR, et al. Human lung homotransplantation. Can Med Assoc J. 1966; 94: 1199-1209.

3.3 SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO PULMONAR

Após o estabelecimento da idéia de preservação pela infusão de solução, a pesquisa deste tema voltou-se para qual seria a melhor composição desta. Os primeiros estudos utilizaram soluções tipo cristalóides como a solução salina fisiológica ou Ringer Lactato como perfusato de preservação⁴⁴. Todavia, os resultados encontrados foram ruins pois a função pulmonar ficava comprometida⁴⁵. A maior explicação parece residir no fato de que essas soluções, que têm como característica a composição de baixa osmolaridade, acabavam ocasionado um importante edema intersticial.

Desenvolvida originalmente para preservação renal, a solução conhecida como Euro-Collins (EC) foi a primeira a ser difundida na prática clínica do transplante pulmonar apresentando resultados satisfatórios. Seu diferencial residia no fato da sua composição ser considerada tipo intracelular, ou seja, com maior concentração de K^+ e reduzida concentração de Na^+ . O princípio é que durante o período de isquemia há perda da função da Na^+/K^+ -ATPase ao nível celular, e como a EC possui composição eletrolítica similar a da célula, essa reduz o gradiente iônico transmembrana, minimizando o influxo de sódio e a saída de potássio, prevenindo o edema celular. Em trabalhos experimentais a EC mostrou-se capaz de preservar adequadamente a função pulmonar com até 6 horas de isquemia fria⁴⁶.

Outra solução tipo intracelular que foi pesquisada para preservação pulmonar foi a conhecida como Universidade de Wisconsin (UW), criada na década de 1980 para o transplante hepático. Apesar de alguns estudos em modelos animais apontarem para possível superioridade da UW frente a EC

na preservação pulmonar^{47,48}, a UW não foi capaz de prolongar significativamente o tempo de isquemia na prática clínica e por isso acabou sendo utilizada por poucos centros.

A idéia de usar uma solução extracelular (maior concentração Na^+ e menor de K^+) para preservação pulmonar apareceu no Japão em meados da década de 1980. Acredita-se que a alta concentração de potássio de soluções intracelulares possa ser a responsável pela despolarização das membranas celulares da musculatura lisa, aumentando o tônus vascular provocando vasoconstrição na circulação pulmonar⁴⁹. Isso resulta em uma má distribuição do perfusato nos pulmões, uma preservação insatisfatória e, conseqüentemente, uma função pulmonar ruim após o transplante. Além disso, outros estudos experimentais envolvendo cultura celular mostraram que a alta concentração de potássio afeta diretamente a função da célula endotelial e causa lesão ao pneumócito tipo II⁵⁰.

O trabalho pioneiro na utilização de soluções extracelulares foi publicado por Fujimura et al. que demonstraram, a superioridade de uma solução extracelular contendo dextran para aumentar a pressão oncótica do perfusato e fosfato como tampão, em relação a EC⁵¹. A partir daí diversos grupos, destacando-se o canadense, começaram a estudar e publicar trabalhos com soluções semelhantes pobres em potássio e com acréscimo de dextran o que determinou a alcunha em inglês pelas quais estas soluções são conhecidas: *low-potassium-dextran* (LPD).

Dois mecanismos são apontados como justificativa para a adição do Dextran à solução de preservação pulmonar: sua pressão oncótica de 24 mmHg quando diluída em uma concentração de 5%, colabora prevenindo a

formação de edema tecidual. Além disso, por formar um “revestimento” sobre a superfície das células endoteliais e plaquetas, sua presença melhora a capacidade de deformação das hemácias, prevenindo a agregação eritrocitária e ocasionando um efeito antitrombótico⁵².

Maccherini et al. em 1991⁵³ publicaram um estudo usando cultura de pneumócitos tipo II de ratos onde concluíram que a solução LPD é menos citotóxica do que EC, possivelmente pelos níveis mais baixos de K^+ , além de permitir maior atividade metabólica nas células epiteliais alveolares.

Todavia, a solução de LPD passaria ainda por uma importante modificação no início dos anos 1990, a adição de glicose. Isso ocorreu a partir do trabalho de Date et al. que demonstraram que a glicose adicionada à solução LPD funcionava como um substrato para a manutenção do metabolismo aeróbico que ocorria nos pulmões insuflados⁵⁴. A solução foi acrescida da glicose foi então denominada LPD-Glicose e com o nome comercial de Perfadex[®] foi aprovada para uso clínico, sendo rapidamente difundida entre os grupos de transplante pulmonar.

Diversos estudos foram desenvolvidos utilizando-se a LPD-Glicose. Alguns estudos experimentais com análise ultra-estrutural e de microscopia eletrônica demonstraram que ela é capaz de reduzir a produção de radicais livres de oxigênio pelas células endoteliais⁵⁵, limitar a perda de função e metabolismo do surfactante alveolar⁵⁶ e conservar melhor a integridade estrutural do pulmão⁵⁷. Todavia, uma melhor preservação estrutural nem sempre se traduziu em melhor função pulmonar após curtos períodos de isquemia. Por isso, a grande comprovação da melhor preservação garantida com a solução de LPD-Glicose veio dos trabalhos comparativos. Em

trabalhos experimentais, após períodos superiores a 8 horas de isquemia, pulmões preservados com LPD-Glicose sempre demonstraram uma melhor função do que aqueles preservados com soluções de EC e UW^{58,59}. Steen et al.⁶⁰ obtiveram excelente função pulmonar após 24 horas de preservação com LPD-Glicose e isquemia fria em um modelo de transplante pulmonar unilateral em porcos.

Os bons resultados da solução de LPD-Glicose também foram sustentados por estudos clínicos retrospectivos. Na última década sete estudos foram publicados comparando LPD-Glicose com a EC. Em cinco estudos, os autores concluíram que a preservação pulmonar obtida com o LPD-Glicose era superior⁶¹⁻⁶⁵. Verificou-se neste grupo melhores índices de oxigenação no pós-operatório imediato, menor incidência de disfunção primária do enxerto, menor tempo de ventilação mecânica, além de uma tendência a uma menor mortalidade em 30 dias. Nos outros dois estudos⁶⁶⁻⁶⁷, os resultados obtidos foram semelhantes nos dois grupos.

Com os excelentes resultados obtidos nos estudos experimentais e com a confirmação dos mesmos na prática clínica, a solução de LPD-Glicose passou a ser adotada pela maior parte dos centros no mundo incluindo os brasileiros.

Outra solução extracelular estudada para preservação pulmonar é a conhecida pelo nome comercial de Celsior[®] (Genzyme, Kendal, USA). Foi desenvolvida sob especificações para preservação de corações para transplante, entretanto, obteve resultados satisfatórios para preservação pulmonar em estudos experimentais^{68,69}. Seu diferencial reside na presença de glutatona, histidina e lactobionato, antioxidantes que reduzem a injúria

causada por radicais livres de oxigênio. Em trabalhos comparativos com a LPD-Glicose, o Celsior® obteve alguns resultados superiores^{70,71}. No entanto, na maioria deles as duas soluções demonstraram desempenho semelhante, ou para períodos superiores a 12h a superioridade de resultados ficou com a LPD-Glicose^{72,73}. Atualmente poucos grupos utilizam regularmente o Celsior® na prática clínica do transplante pulmonar.

3.4 OUTRAS CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESERVAÇÃO PULMONAR

Além da técnica de preservação e da solução empregada diversos trabalhos foram realizados estudando outras intervenções que possam ocasionar melhora da preservação pulmonar, entre esses se destacam: a adição de fármacos, o estado de insuflação pulmonar e a concentração de oxigênio.

3.4.1 Fármacos

Variados fármacos já foram pesquisados, tanto para uso conjunto no momento da perfusão pulmonar, quanto para uso no doador antes da captação, dentre este discutiremos abaixo somente as drogas freqüentemente utilizadas na prática clínica.

Prostaglandinas ou prostaciclina são potentes vasodilatadores pulmonares. Sua utilização foi inicialmente motivada para contrapor o efeito de vasoconstrição determinada pela hipotermia e pela elevada concentração de potássio de algumas soluções, possibilitando uma distribuição mais uniforme do perfusato nos pulmões⁷⁴. Evidências demonstram que estas substâncias possam ter outras ações benéficas como a imunossupressão⁷⁵,

inibição da agregação plaquetária e do seqüestro leucocitário⁷⁶ e possível redução da permeabilidade vascular⁷⁷. Apesar de alguns estudos questionarem o valor das prostaglandinas^{78,79}, e mesmo expor alguns efeitos deletérios⁸⁰, a maior parte dos grupos de transplante de pulmão as utiliza de forma rotineira na prática clínica com aparente resultado favorável^{81,82}.

Os corticosteróides são regularmente utilizados como adjuvantes a preservação, podendo ser administrados no doador previamente a captação ou juntamente com o perfusato^{83,84}. Seu uso baseia-se na sua propriedade anti-inflamatória e estabilizadora de leucócitos.

3.4.2 Temperatura

Desde os primeiros trabalhos de preservação estabeleceu-se o conceito de que a isquemia hipotérmica é melhor tolerada que a normotérmica⁸⁵. Entretanto, qual seria a temperatura ideal para a melhor preservação pulmonar ainda é motivo de discussão. A temperatura média mais empregada pelos grupos transplantadores é 4°C, tanto para o resfriamento do órgão pela perfusão, quanto para o seu transporte. E apesar de uso clínico difundido da hipotermia a 4°C, pouca evidencia científica sobre este valor de temperatura pode ser encontrado na literatura. Dados de trabalhos experimentais sugerem que isquemias a 10°C são melhores suportadas por pulmões de coelhos que isquemias a 4°C ou 15°C⁸⁶. Alguns autores acreditam que a 10°C deva existir um baixo, porém presente, grau de metabolismo celular, o que pode ser benéfico quando a solução de preservação apresenta um substrato metabólico para o tecido pulmonar (como a glicose do LPD-Glicose). Todavia, estudo experimental em cães

falhou em comprovar a melhor preservação a 10°C ou a 4°C pós 18 horas de isquemia⁸⁷.

3.4.3 Grau de insuflação pulmonar

Evidências apontam que o pulmão é melhor preservado se for mantido em estado inflado⁸⁸. A resistência vascular pulmonar é menor quando o pulmão encontra-se inflado. Esta consideração é muito importante no momento da perfusão do pulmão com a solução de preservação, porque, para uma boa distribuição da solução em todo o território pulmonar é preciso que o bloco pulmonar esteja sendo ventilado e de preferência recrutado para evitar a presença de áreas de atelectasia⁴⁵.

3.4.4 Fração de oxigênio

Não se sabe qual seria a concentração exata de gás para ventilar e preservar o pulmão. Segundo trabalhos de Veith et al., a concentração com 100% de oxigênio é, potencialmente, mais deletéria do que concentrações mais pobres de oxigênio⁸⁹. Entretanto, outros grupos reportam, em trabalhos não controlados da década de sessenta, o uso de oxigênio hiperbárico com bons resultados, estas pesquisas, todavia, não foram reproduzidas^{90,91}. Novos estudos são necessários para determinar qual a fração de oxigênio ideal para preservação pulmonar.

3.5 O DESENVOLVIMENTO DO MODELO *EX VIVO*

O desenvolvimento do sistema de perfusão *ex vivo* para pulmões humanos conforme conhecemos na atualidade começou a ser desenvolvido no final da década de noventa quando o grupo Sueco da Universidade de Lund no intuito de elevar o número de doadores viáveis para transplante voltou suas atenções para o uso de doadores com parada cardíaca¹². Todavia, além das questões éticas delicadas envolvidas com essa modalidade de doação, eles esbarraram em um problema técnico importante: a falta de uma forma de avaliação, pois, ao contrário do que é habitualmente feito, nos pacientes com parada cardíaca não é possível a realização de exames e de uma avaliação mesmo que superficial, mas objetiva do estado do órgão. O Prof. Stig Steen propôs e começou a desenvolver um circuito de tal sorte que o pulmão pudesse ser avaliado funcionalmente após sua retirada.

A perfusão pulmonar em circuitos mecânicos não é um conceito novo, sendo amplamente utilizada em estudos de fisiologia pulmonar para animais de pequeno e médio porte. Porém, a perfusão *ex vivo* de pulmões humanos apresentava limitação técnica importante devido a sua incapacidade de manter a integridade da barreira alvéolo-capilar, aumento da resistência vascular e edema o que levava à inexorável perda de função pulmonar.

O grupo do prof. Steen, através de estudos em porcos, desenvolveu não somente o sistema de perfusão com a modificação de circuito de extra-corpórea, mas fundamentalmente uma solução que pudesse contornar a formação do edema pulmonar e perda de função. Estas pesquisas originaram a solução que ganhou o nome de *Steen Solution* (Vitrolife; Gothenburg,

Suécia) que devido a alta pressão oncótica, permite a realização da perfusão pulmonar sem a progressiva formação de edema¹⁵.

Após o sucesso dos experimentos com porcos a perfusão pulmonar *ex vivo* foi usada pela primeira vez clinicamente pelo grupo do Prof. Steen em 2000, quando foi realizado o primeiro transplante pulmonar de um doador em parada cardíaca na Universidade de Lund⁹². O doador era um homem de 54 anos que sofreu parada cardíaca após um infarto agudo do miocárdio. A avaliação funcional dos pulmões foi realizada pelo sistema *ex vivo*, após obtenção de uma gasometria que demonstrou adequada capacidade de troca do pulmão doado, o transplante foi realizado com sucesso.

O sistema de perfusão por eles utilizado é formado por: uma caixa rígida e transparente de formato retangular, que permite o suporte do bloco pulmonar, bem como a entrada e conexão do conjunto de tubos de circulação extra-corpórea; uma bomba centrífuga; um trocador de calor; um oxigenador de membranas. Para monitorização são utilizados um transdutor de pressão, um fluxômetro e um termômetro, bem como os respectivos monitores. O perfusato desse circuito consiste de 1500 ml de *Steen Solution*, acrescido de uma quantidade variável de concentrados de hemácias, resultando em um perfusato com um hematócrito em torno de 15%. Para permitir a “desoxigenação” do perfusato no oxigenador de membrana uma mistura de gases (nitrogênio, oxigênio e dióxido de carbono) é utilizada, sendo seu fluxo ajustado de forma a obter uma concentração de gases no perfusato que se assemelhe ao sangue venoso. Segundo o protocolo de Lund o fluxo e a temperatura são gradualmente aumentados. A ventilação inicia-se quando a temperatura atinge 32 °C e o fluxo máximo nunca deve ultrapassar valores

que determinem uma pressão de artéria pulmonar maior que 20mmHg. A avaliação mais importante é obtida pela gasometria do perfusato colhido das veias pulmonares, quando a temperatura atinge 37 °C¹³.

Após o estabelecimento do modelo, os pesquisadores passaram a apostar em outro emprego do método além da avaliação dos doadores com coração parado. Steen e colaboradores acreditaram que muitos dos pulmões não aceitos para transplante poderiam ter sido utilizados se uma avaliação adicional pudesse garantir a sua viabilidade. Nasceu assim o uso da perfusão *ex vivo* para a avaliação dos chamados doadores marginais e desta forma começou a despertar interesse em outros grupos⁹³.

Todavia, durante suas pesquisas os autores se depararam com mais uma descoberta, a aparente “melhora” da função pulmonar após a reperfusão no sistema *ex vivo*. A explicação teórica para isso reside em algumas características do sistema como permitir manobras de recrutamento alveolar, permitir limpeza mais efetiva das secreções brônquicas, remoção de eventuais coágulos da circulação pulmonar; melhor distribuição de volume e pressão de ventilação, sem a interferência da caixa torácica e diafragma, redução do edema pulmonar devido a alta pressão oncótica do perfusato, remoção de células inflamatórias e eventual redução do grau de inflamação pulmonar, melhora da microvasculatura devido a propriedades do Dextran⁹⁴. Nasceu assim o conceito de “Recondicionamento pulmonar *ex vivo*” onde órgãos inicialmente não aptos ao transplante pulmonar podem ser “recuperados” após a reperfusão no sistema.

Após estudos experimentais com excelente resultado, principalmente em porcos, o grupo da Universidade de Lund realizou em 2005 o primeiro transplante pulmonar usando um pulmão inicialmente rejeitado submetido ao condicionamento pulmonar *ex vivo*⁹⁵. O doador foi um homem de 19 anos vítima de acidente automobilístico, com importantes traumas crânio-encefálico e torácico. Realizada a definição da morte encefálica e autorização para doação, a radiografia de tórax mostrava contusão pulmonar bilateral e a gasometria arterial pré-captção colhida mostrava baixa PaO_2 (última colhida 67mmHg com FiO_2 de 70%); por esses motivos os pulmões não foram aceitos para transplante pulmonar. Acionada a equipe do Hospital Universitário de Lund que realizou a captação e levou o órgão para avaliação *ex vivo*. Os pulmões captados permaneceram no sistema por aproximadamente 1 hora, segundo o protocolo estabelecido pela equipe sueca, quando nova avaliação gasométrica foi realizada demonstrando agora uma PO_2 em torno de 391,5mmHg com $FiO_2 = 100\%$. A avaliação macroscópica demonstrava, apesar de pontos hemorrágicos na superfície pulmonar, uma aparente boa complacência. O órgão foi então considerado apto para o transplante e o receptor foi convocado.

Nesse momento, para preservar o pulmão a equipe do Prof. Stig Steen optou por deixar o órgão sobre o ECMO-tópico, realizado com a redução da temperatura do perfusato para 25°C e posterior parada da ventilação e da perfusão, com imersão do órgão na solução em estado semi-inflado. A solução foi mantida oxigenada e re-circulando em temperatura controlada em 8 °C por aproximadamente 10h até a chegada do receptor e realização do transplante. O paciente receptor foi um homem de 70 anos

com DPOC já dependente de oxigênio por 3 anos. O transplante realizado foi unilateral esquerdo, sendo que, os períodos intra-operatório e o pós-operatório imediato evoluíram sem intercorrências. A evolução tardia do paciente também foi satisfatória, sem diferenças com o transplante habitual, até o oitavo mês pós-operatório, quando foi diagnosticado no pulmão transplantado um linfoma de grandes células positivo para Epstein-Barr vírus. O paciente foi então tratado com quimioterapia tendo boa evolução e desaparecimento do tumor. Todavia, no décimo primeiro mês pós transplante o paciente evoluiu com quadro súbito de sepse e óbito.

Em 2009 esse grupo publicou série com seis pacientes transplantados com pulmões inicialmente rejeitados e submetidos a perfusão pulmonar *ex vivo*, com excelentes resultados, demonstrando 100% de sobrevida em 3 meses e 67% em um ano, sendo os óbitos aparentemente não relacionados com a perfusão⁹⁶.

O grupo canadense da Universidade de Toronto, estimulado pelos resultados iniciais publicados, iniciou seus estudos com o modelo *ex vivo*. Sua enorme experiência no transplante pulmonar aliados a grande disponibilidade de recursos acelerou seu desenvolvimento, tanto que, podemos considerá-lo hoje, o maior detentor de experiência com essa técnica. Uma característica deste grupo foi a preocupação em prolongar o tempo de perfusão, uma vez que o protocolo do Prof. Steen preconizava pouco mais que uma hora de perfusão. Para esta finalidade o grupo de Toronto estabeleceu em seu protocolo de perfusão as seguintes modificações: uso de perfusato acelular, constituído somente de *Steen Solution* sem adição de hemácias; fluxo de perfusão máximo calculado como

aproximadamente 40% do débito cardíaco; e a manutenção da pressão de artéria pulmonar entre 10 e 15 mmHg. O uso de um perfusato acelular facilita a logística por diminuir custo, além de evitar eventual conflito ético da utilização de hemoderivados para estudos de órgãos que nem sempre serão utilizados clinicamente. Os potenciais prejuízos do uso de sangue no perfusato incluem a hemólise ocasionada pelo trauma mecânico sofrido pelas hemácias circulando no sistema, bem como atividade pró inflamatória própria da transfusão. O grupo de Toronto demonstrou que a ausência de glóbulos vermelhos não compromete a avaliação da função pulmonar, pois, é alto o grau de difusão de oxigênio no perfusato de *Steen Solution*, permitindo assim a realização de gasometrias fidedignas. Estas modificações foram bem sucedidas para prolongar o tempo de perfusão *ex vivo* por até 12 horas, sendo estes resultados publicados por Cypel et al⁹⁷.

Em 2010, o grupo de Toronto divulgou os resultados de 16 pacientes transplantados com pulmões submetidos a avaliação e condicionamento *ex vivo*: não houve mortalidade em 30 dias e a incidência de disfunção primária do enxerto foi semelhante aos pacientes transplantados sem perfusão pulmonar *ex vivo* no mesmo período⁹⁸. Este grupo também publicou outros trabalhos com novas propostas de tratamento do pulmão enquanto no sistema de perfusão, por exemplo o publicado na *Science Translational Medicine*, onde um adenovírus foi utilizado como vetor para a terapia gênica com IL10 durante a perfusão *ex vivo*, com intuito de determinar o aumento dessa interleucina e conseqüente deflagração de potente ação antiinflamatória no órgão a ser transplantado⁹⁹. Em 2011 houve uma nova publicação deste grupo onde 23 pulmões não aceitos para transplante foram

submetidos a condicionamento *ex vivo* por 4h. Destes 20 permaneceram estáveis no sistema, sendo então, transplantados com bons resultados¹⁰⁰.

Devido a grande perspectiva de aplicabilidade clínica a perfusão pulmonar *ex vivo* figura hoje como uma das principais linhas de pesquisas para diversos grupos de transplante pulmonar em todo mundo. No Brasil, o grupo de transplante pulmonar InCor (HCFMUSP), iniciou seus estudos em 2008 sendo que os primeiros estudos experimentais de pulmões humanos foram publicados a partir de 2009¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

Por este sistema permitir a avaliação funcional e histológica de pulmões humanos com a possibilidade de estudar os efeitos da lesão de isquemia-reperfusão, esse método foi o escolhido para comparar os efeitos de dois métodos de preservação pulmonar em nosso estudo.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de uma pesquisa experimental, controlada e aleatorizada que consistiu na avaliação funcional e histológica em modelo estabelecido de isquemia-reperfusão de pulmões retirados de doadores cadáveres. A intervenção aplicada foi preservação de pulmões doados para transplante com a técnica denominada ECMO-Tópico. No grupo controle, preservação pulmonar foi realizada com a técnica habitual de isquemia fria após perfusão única de solução de preservação gelada. A qualidade da preservação dos pulmões captados nos dois grupos foi avaliada após 8 horas de preservação e 60 minutos de reperfusão em um modelo de avaliação pulmonar *ex vivo*. As variáveis de desfecho foram definidas na avaliação funcional, hemodinâmica e histológica conforme detalhado nas próximas seções deste capítulo.

As hipóteses formuladas para a pesquisa foram as seguintes:

Hipótese nula: a qualidade da preservação pulmonar (estimada pela capacidade de oxigenação) é a mesma com o ECMO-tópico e a isquemia fria

Hipótese alternativa (bilateral): a qualidade da preservação pulmonar é diferente nos dois grupos.

Planejar o tamanho da amostra implicaria em delinear o estudo de forma que tivesse poder substancial ($\beta < 0,1$) para rejeitar a hipótese nula quando a magnitude de efeito fosse muito pequena e, portanto, clinicamente

insignificante (p. ex., uma diferença de 5 mmHg na média da PO_2). Isso resultaria em uma amostra muito grande, inviabilizando uma pesquisa que envolve a captação de pulmões humanos. O tamanho amostral foi então estabelecido por conveniência. Determinou-se o número de 14 pulmões a serem estudados, sendo estes provenientes de 7 doadores.

No intuito de minimizar a heterogeneidade encontrada entre diferentes doadores, propusemos um modelo de estudo com a separação do bloco pulmonar em direito e esquerdo permitindo que um lado seja submetido a intervenção e o outro seja o controle. Esse modelo foi testado e esses resultados foram publicados no *Jornal Brasileiro de Pneumologia*¹⁰⁵.

O lado a ser submetido a intervenção ou ao controle foram designados aleatoriamente (usando um algoritmo computadorizado), criando-se assim dois grupos:

(1) Lado ECMO-tópico: composto de 7 pulmões preservados pela técnica ECMO-tópico.

(2) Grupo Isquemia Fria: composto de 7 pulmões preservados pela técnica habitual de isquemia fria.

A seleção dos casos ocorreu no período de dezembro de 2009 a agosto de 2010 seguindo os seguintes critérios de inclusão:

- Pacientes em morte encefálica notificados para doação de órgãos no período acima;

- Pacientes internados nos hospitais em que atuam a Organização de Procura de Órgãos (OPO) do HCFMUSP e a OPO da Santa Casa de São Paulo;

- Doadores cujos pulmões foram recusados pelas equipes de transplante pulmonar, mas que seriam submetidos a procedimento cirúrgico para captação de outros órgãos e tecidos;

- Doadores cujos familiares assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os critérios de exclusão foram propostos no sentido de garantir que não existissem diferenças detectáveis pré estudo entre os dois pulmões de cada doador. Foram considerados critérios de exclusão:

- O encontro que qualquer alteração unilateral nos pulmões detectada no exame radiológico pré-captação (por ex.: sinais de broncopneumonia, opacidades, contusões, entre outros).

- O encontro que qualquer alteração unilateral nos pulmões inspecionados no momento da operação para captação (por ex.: congestão pulmonar, grande quantidade de aderências, presença de bolhas ou outras alterações parenquimatosas em apenas um dos lados).

O estudo (Protocolo de Pesquisa nº 0212/08) foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HCFMUSP (Anexo 1), inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2). Este foi assinado pelo responsável pelo doador em todos os casos. Por envolver a doação de órgãos humanos todo protocolo foi avaliado e aprovado pela Organizações

de Procura de Órgãos dos dois hospitais participantes e também pela Central de Transplantes da Secretaria de Estado da Saúde Governo de São Paulo.

4.2 PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS

Os pulmões utilizados na pesquisa foram provenientes de doadores não aceitos para transplante pulmonar pelas equipes transplantadoras, que estivessem nos hospitais onde atuam as Organizações de Procura de Órgãos do HCFMUSP e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Após a confirmação da morte encefálica do paciente, a Central de Transplantes do Estado de São Paulo notificava as equipes de captação de órgãos e tecidos. Se os pulmões doados fossem recusados pelas equipes de transplante pulmonar, eles eram disponibilizados para a pesquisa, mediante autorização dos familiares do doador. Importante salientar que, simultaneamente à captação do pulmão para estudo, os outros órgãos (fígado, rins e pâncreas) destes doadores foram extraídos pelas equipes captadoras competentes para outros transplantes, sem nenhum prejuízo. A abordagem da família do doador para obtenção da assinatura no termo de consentimento foi realizada em todos os casos por enfermeiros das organizações de procura de órgãos. Isto porque estes são treinados para esta função e a realizam habitualmente evitando o surgimento de quaisquer problemas no processo de doação que potencialmente interferisse na obtenção de autorização para a retirada dos outros órgãos que seriam diretamente utilizados para finalidades terapêuticas.

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1 Captação Pulmonar e Transporte

A técnica usada para a captação pulmonar na pesquisa foi a preconizada e habitualmente utilizada pela equipe de transplante pulmonar do InCor HCFMUSP. O doador foi posicionado em decúbito dorsal horizontal com um coxim sob as escápulas. Após a preparação anestésica (cateterismo da artéria radial, acesso venoso central, etc.), realizou-se esternotomia mediana, concomitante com a abertura do abdome pelas equipes de captação de fígado e/ou rim. Procedeu-se a abertura do pericárdio e das pleuras mediastinais, seguida da dissecação e reparo das veias cavas superior e inferior. Realizou-se sutura em bolsa com fio de polipropileno 4-0 no tronco pulmonar, através da qual introduziu-se cânula arterial aramada ponta curva (80°) de 18 Fr (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, Brasil) para perfusão com a solução de preservação. Imediatamente antes da perfusão com a solução de preservação um fragmento do lobo médio e língula foram retirados para análise histológica posterior.

Assim que as outras equipes de captação já estivessem com suas medidas para a perfusão de seus respectivos órgãos prontas, procedeu-se a administração endovenosa de heparina (300 U/kg). Neste momento realizou-se de forma seqüencial: ligadura da veia cava superior; secção da veia cava inferior logo acima do diafragma; pinçamento da aorta torácica; iniciou-se a perfusão da artéria pulmonar com 50 ml/kg da solução de preservação ativada (adição de 2,5 ml de bicarbonato de sódio 10 % e 0,6 ml de cloreto

de cálcio de 100 mg/ml em cada litro da solução) a 4 °C; abertura da aurícula esquerda para drenagem da solução de preservação; colocação de solução salina gelada nas cavidades pleurais para o resfriamento dos pulmões; aspiração de sangue do doador. Durante todo o período de infusão da solução de preservação, os pulmões foram ventilados para evitar a formação de atelectasias e permitir uma distribuição mais homogênea da solução. O início da isquemia foi registrado.

Terminada a perfusão, a cânula foi retirada e a extração pulmonar iniciada. As veias pulmonares foram seccionadas e separadas do átrio esquerdo. A veia cava superior foi seccionada logo abaixo da ligadura, liberando-a da artéria pulmonar direita. A aorta ascendente foi seccionada, o tronco pulmonar amputado antes da sua bifurcação e o coração retirado. Iniciou-se a liberação dos pulmões através dos ligamentos pulmonares. Liberou-se todo o tecido mediastinal anterior ao esôfago até três ou quatro anéis acima da carina. Procedeu-se à retirada em bloco dos pulmões, incluindo todo o pericárdio e estruturas adjacentes. Liberados os pulmões e dissecada a traquéia distal, esta foi ocluída com os pulmões insuflados, sendo o bloco retirado do campo operatório.

Para o transporte, os pulmões foram armazenados em saco estéril, imersos em solução salina gelada e transportados em caixa térmica preenchida com gelo. Todos os pulmões após a chegada ao InCor (local do estudo) foram separados em direito e esquerdo por seção do átrio esquerdo, artéria pulmonar e da carina traqueal (Figura 2). Isso para, conforme

aleatorização prévia, um lado ser submetido à preservação por ECMO-tópico e o outro por isquemia fria.

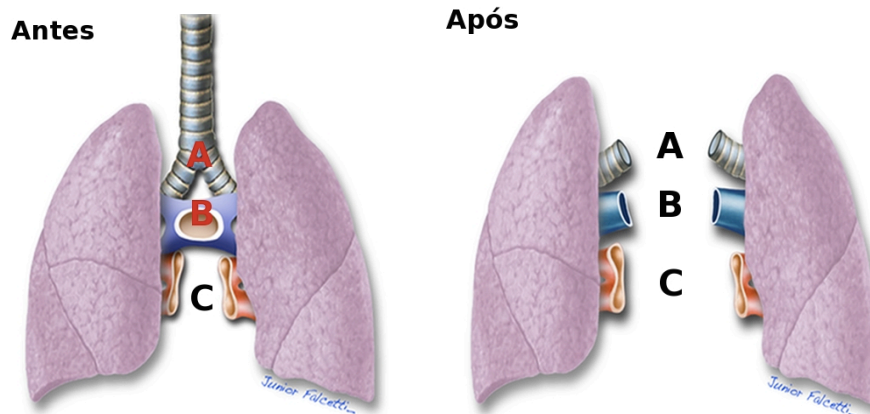


Figura 2. Esquemas demonstrando o bloco pulmonar antes e após separação pulmonar. A: Brônquios; B: Artérias Pulmonares; C: Veias Pulmonares.

4.3.2 Preservação: ECMO-tópico ou Isquemia Fria

O ECMO-tópico foi realizado pela completa imersão do órgão na solução de perfusão *Steen Solution* em caixa de contenção (Figura 3) confeccionada pelo nosso grupo. A caixa de contenção foi fabricada com a adaptação de recipiente de plástico com volume aproximado de 3L onde foram adaptados um tubo para a infusão de solução e outro para a drenagem da mesma. A circulação da solução pela caixa de contenção foi realizado por bomba centrífuga (Bioengenharia InCor) e conjunto de tubos e oxigenador de membrana para circulação extra-corpórea modelo infantil (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, Brasil). Completou o sistema um trocador de calor (Bioengenharia InCor).

Figura 3. Foto da caixa de contenção utilizada para o ECMO-tópico.

A solução foi circulada continuamente pela bomba centrífuga em fluxo aproximado de 1l/min com constante oxigenação via oxigenador de membrana recebendo oxigênio com fluxo de 5l/min, A temperatura média foi mantida pelo trocador de calor com resfriamento objetivando uma temperatura de 8°C, monitorado por sensor retal de temperatura (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, Brasil) colocado na veia pulmonar e conectado ao termômetro clínico digital AG-2000 (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, Brasil).

A isquemia fria foi realizada pela manutenção do pulmão em saco plástico com envolto em solução salina gelada a 4°C com temperatura controlada em refrigerador com termômetro digital.

Figura 4. Foto da caixa de contenção utilizada para o ECMO-tópico com pulmão imerso na solução.

4.3.3 Modelo *Ex Vivo* Modificado para o Estudo

O sistema de perfusão *ex vivo* desenvolvido no InCor representa uma adaptação do sistema e do protocolo preconizados pelo Prof Steen com algumas das modificações de proteção estabelecidas pelo grupo canadense, como o uso de solução acelular, além do uso de materiais nacionais de circulação extracorpórea como forma de viabilizar a linha de pesquisa em nosso país^{13,97}.

A primeira modificação realizada foi a utilização de circuito de circulação extracorpórea infantil, permitindo a redução do volume de solução de preservação. O sistema é formado por conjunto de tubos, reservatório venoso, oxigenador de membrana do modelo infantil (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, Brasil); além de um trocador de calor e uma bomba centrífuga (Bioengenharia InCor, São Paulo, Brasil) (Figura 4) Após estudo de viabilidade estas modificações foram publicadas no Jornal Brasileiro de Pneumologia em 2009¹⁰¹.

Figura 5. O sistema de perfusão pulmonar *ex vivo*: conjunto de tubos para circulação extracorpórea, bomba centrífuga, reservatório venoso e oxigenador de membranas.

O bloco pulmonar é colocado em uma caixa rígida transparente (Figura 5) desenvolvida especificamente para este finalidade (Vitrolife, Gothenburg, Suécia). Uma sonda orotraqueal (Figura 6) foi adaptada com um conector em "Y" para possibilitar a intubação concomitante dos dois brônquios principais. Uma cânula de perfusão também em "Y" foi utilizada para a conexão das artérias pulmonares ao tubo arterial do sistema de extracorpórea (Figura 6). Esta cânula possui sondas embutidas para acoplamento em transdutor de pressão, possibilitando monitorização contínua da pressão de artéria pulmonar (PAP) de forma independente e paralela para cada artéria pulmonar. O retorno da solução pelas veias pulmonares é realizado diretamente para a caixa de contenção, sendo drenado para o reservatório venoso por gravidade. O sistema é preenchido com 1500ml de *Steen Solution* (Vitrolife, Gothenburg, Suécia). Conforme mencionado acima, optamos por não usar sangue na circulação, a exemplo do que faz o grupo de Toronto.

Figura 6. Caixa para suporte do bloco pulmonar (XVIVO Chamber®) no sistema de perfusão pulmonar *ex vivo*.

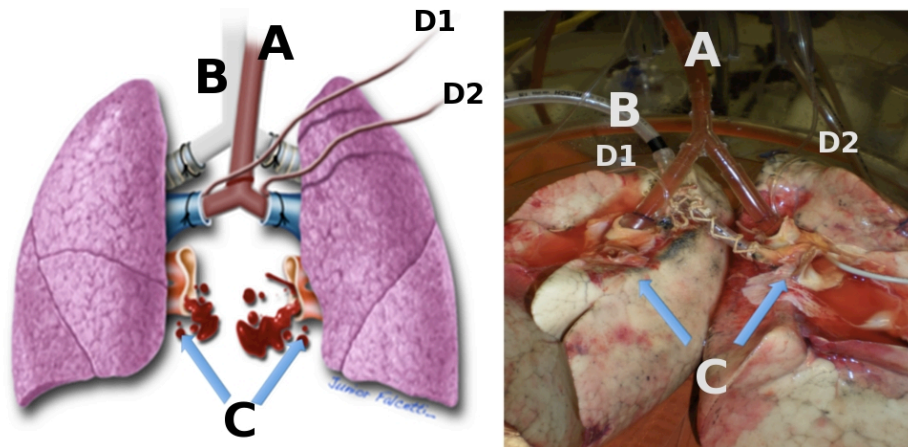


Figura 7. Esquema e foto demonstrando a reconexão pulmonar para perfusão e ventilação no sistema *ex vivo*. A: Cânula em Y conectada às artérias pulmonares; B: Cânula em Y conectada aos cotos brônquicos e ao ventilador; C: Veias pulmonares separadas drenando livremente para recipiente de contenção; D1 e D2: Sondas para a medida pressórica de cada artéria pulmonar.

Figura 8. Foto ilustrando as cânulas em Y utilizadas para reconexão pulmonar para perfusão e ventilação no sistema *ex vivo*. A: Cânula em Y para conexão dos cotos brônquicos e ventilador; B: Cânula em Y para conexão dos cotos arteriais ao circuito de perfusão, detalhe nas setas 1 e 2 para a saída dos transdutores de pressão independentes.

Usamos como fluxo de perfusão, 40% do débito cardíaco (DC) estimado ($DC = 3 \times \text{área de superfície corpórea}$). Iniciamos a perfusão com a solução na temperatura de 20°C e um fluxo inicial de 10% do calculado. A temperatura é gradualmente elevada por meio do trocador de calor até 37°C em aproximadamente 30 minutos. O fluxo também é lentamente

incrementado, atingindo 30% do calculado em mais ou menos 30 minutos, e alcançando o fluxo máximo por volta de 60 minutos. Se a PAP atinge 20 mmHg antes do fluxo máximo calculado, este é mantido em um valor mais baixo até o fim da perfusão para minimizar a formação de edema. Quando a temperatura chega a 32°C (geralmente após 20 minutos do início da perfusão pulmonar *ex vivo*), a ventilação é iniciada. Nesse momento, um fluxo de gás (CO₂ 7% + N₂ 93%) é administrado ao sistema através do oxigenador de membrana para “desoxigenar” o perfusato, de forma que o mesmo, ao entrar na artéria pulmonar, tenha uma composição gasosa semelhante ao sangue venoso. Manobras de recrutamento até uma pressão máxima de 25 cmH₂O são realizadas para desfazer eventuais atelectasias. O ventilador é mantido com os seguintes ajustes: volume corrente de 8 ml/kg, frequência de 7 irpm, FiO₂ de 100% e PEEP de 5 cmH₂O. Essa estratégia de ventilação é protetora para evitar quaisquer traumas adicionais. Após o sistema atingir a estabilidade (fluxo máximo calculado e temperatura de 37°C geralmente por volta de 60 minutos de perfusão pulmonar, o perfusato que sai pelas veias pulmonares é colhido para análise gasométrica e os valores hemodinâmicos são registrados.

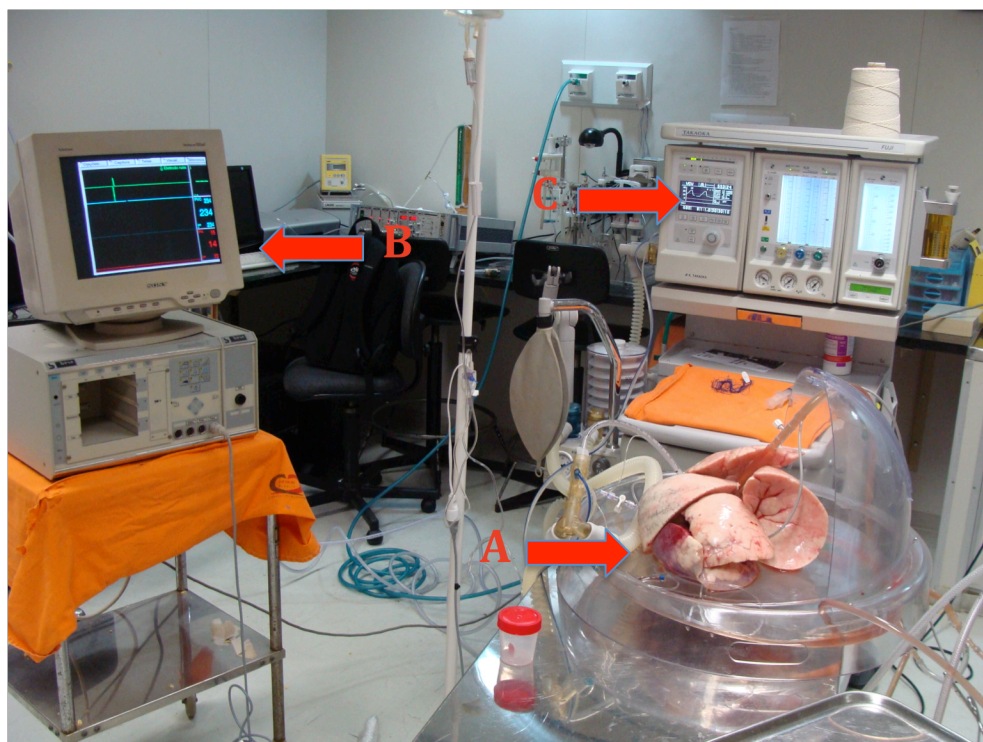


Figura 9. Visão geral da sala de reperfusão pulmonar. A: Caixa de contenção pulmonar (XVIVO Chamber®); B: Monitor de pressão; C: Ventilador.

4.4 VARIÁVEIS DO ESTUDO

4.4.1 Avaliação hemodinâmica

A pressão de artéria pulmonar (PAP) de cada pulmão foi continuamente monitorizada, através das sondas individuais, durante todo o tempo da reperfusão. Quando o sistema atingiu a estabilidade, a PAP e o fluxo máximo atingido foram registrados para o cálculo da resistência vascular pulmonar (RVP). A fórmula utilizada para o calculo da RVP foi:

$$\text{RVP (dina.s.cm}^{-5}\text{)} = \text{PAP (mmHg)} / \text{Fluxo (l/min)} \times 80$$

4.4.2 Avaliação funcional

O principal parâmetro da avaliação funcional era a capacidade de oxigenação, definida pela pressão parcial de oxigênio (PO_2) dosado do perfusato em sua saída pelas veias pulmonares, coletado individualmente entre os lados direito e esquerdo. Outros parâmetros obtidos foram a pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) e o potencial hidrogeniônico (pH) dosados no perfusato em sua saída pelas veias pulmonares, também coletados de forma individual. Medidas realizadas no aparelho ABL 800 flex (Radiometer, Copenhagen, Dinamarca), imediatamente após sua coleta. Para demonstrar que o sistema *ex vivo* foi eficaz na desoxigenação do perfusato, foram colhidas gasometrias da solução após passagem no “oxigenador de membranas”.

4.4.3 Variação do peso

Os pulmões foram pesados individualmente em três momentos: logo depois da captação e separação em direito esquerdo; após preservação no ECMO-tópico ou na isquemia fria e ao final da reperfusão no modelo de avaliação pulmonar *ex vivo*. Tais medidas geraram duas variáveis: a variação de peso pós-preservação (ΔPp) e a variação de peso pós-reperfusão (ΔPr).

$$\Delta\text{Pp (kg)} = \text{peso após isquemia (kg)} - \text{peso após captação (kg)}$$

$$\Delta\text{Pr (kg)} = \text{peso após reperfusão (kg)} - \text{peso após isquemia (kg)}$$

4.4.4 Razão peso úmido-peso seco

Um parâmetro usado para avaliação do edema pulmonar é a razão entre o peso da peça após a reperfusão e o peso após secagem em estufa. Para esta medida assim que encerrada a reperfusão, pesamos separadamente os pulmões esquerdo e direito (peso úmido). Estes foram colocados em estufa a 60 °C por 24 horas, e pesados em seguida (peso seco).

$$\text{Razão U/S} = \text{peso úmido (kg)} / \text{peso seco (kg)}$$

4.4.5 Avaliação histológica

Para a avaliação histológica foram padronizadas as retiradas de fragmentos do lobo médio para o pulmão direito e da língula para o pulmão esquerdo em três diferentes momentos. A primeira biópsia foi feita durante a captação, para avaliação e comparação da condição inicial dos pulmões estudados. A segunda biópsia foi feita após o período de preservação no ECMO-tópico ou na isquemia fria pelas 8 horas estabelecidas no estudo, de modo a indicar se algum dos métodos incorreria em maior preservação da arquitetura tecidual. Já a terceira biópsia tinha o intuito de avaliar se a reperfusão no modelo *ex vivo* propriamente dita, poderia determinar eventual melhora ou piora destes pulmões avaliados e se dependendo do grupo: ECMO-tópico ou isquemia fria, estas alterações seriam mais ou menos presentes.

Os fragmentos de pulmão foram imersos em formalina tamponada a 10% para fixação. Após 24 horas, foram confeccionados blocos de parafina com as amostras, os quais foram seccionados em cortes de 5 µm e corados

com hematoxilina-eosina. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz por patologista experiente em afecções pleuro-pulmonares. Foram analisados 26 parâmetros histológicos em cada caso, sendo eles: Infiltrado septal, Infiltrado pleural, Infiltrado peribronquiolar, Pneumonia organizante, Fibrose peribronquiolar, Foco fibroblástico, Fibrose submucosa bronquiolar, Hipertrofia músculo peribronquiolar, Edema intersticial, Edema alveolar, Espessamento arteriolar, Trombose vascular, Fibrose pleural, Fibrose intersticial, Deposição superficial de fibrina, Fibrina alveolar, Exsudato alveolar, Hemorragia intersticial, Hemorragia alveolar, Reatividade de pneumócitos, Macrófagos alveolares, Descamação bronquiolar, Vasculite, Enfisema, Pigmento e Broncoespasmo. De acordo com a intensidade dessas alterações, o patologista atribuiu um valor para cada parâmetro: 0, ausência; 1, leve; 2, moderado; 3, intenso. Foi definido, dessa forma, o escore de lesão pulmonar (ELP), determinado pela soma do valor de cada parâmetro. O ELP de cada caso podia variar de 0 a 78, de modo que quanto maior era o escore, mais intensa era a lesão tecidual naquela amostra.

As lâminas dos fragmentos descritos acima foram preparadas também para análise imuno-histoquímica, tendo por finalidade a detecção e quantificação de células apoptóticas, usando o In situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Alemanha). Durante o processo de apoptose, ocorre a clivagem do DNA nuclear, levando à formação de quebras na “fita” de DNA e fragmentos de DNA (oligonucleossomos). Essas rupturas de DNA podem ser identificadas pela adição de nucleotídeos marcados com fluoresceína ao terminal livre 3'-OH dos fragmentos de DNA, através de uma reação enzimática. A técnica TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) baseia-

se na capacidade da enzima terminal desoxinucleotidil transferase (TdT) de catalisar a incorporação de desoxiuridina trifosfato (dUTP) aos terminais 3'-OH das "fitas" de DNA.

As lâminas foram desparafinizadas em três banhos de xilol (5 minutos cada banho) e reidratadas em gradiente de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%). Era aplicada a Proteinase K nas lâminas, as quais eram mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, era feita a lavagem das lâminas com dois banhos (3 minutos cada) em PBS (phosphate-buffered saline). Elas eram, então, incubadas com solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,3% e metanol por 30 minutos em temperatura ambiente, e, logo após, lavadas duas vezes em PBS. Na sequência, eram aplicados 50 µl da mistura TUNEL (5 µl da solução da enzima TdT – tubo azul – e 45 µl da solução do nucleotídeo marcado – tubo roxo) em cada amostra. Estas eram colocadas em câmara úmida a 37 °C por 60 minutos. Por fim, as lâminas eram lavadas três vezes em PBS e preparadas com glicerina e lamínula de vidro para análise em microscópio de fluorescência.

As lâminas foram examinadas em microscópio (Axioskop 2 Plus; Carl Zeiss, Jena, Alemanha) de fluorescência, através de um filtro de 590 nm, com um aumento de x400. O sistema incluía uma câmera acoplada ao microscópio para captura das imagens, ligada a um computador. Através do software de processamento de imagens digitais AxioVision versão 4.7 (Carl Zeiss), a imagem era mostrada no monitor em um campo de 0,02 mm², e as células apoptóticas eram visualizadas na cor verde brilhante. As células apoptóticas foram contadas em dez campos escolhidos aleatoriamente.

Para avaliar a presença de células inflamatórias no tecido foi realizada técnica de imunohistoquímica para identificação de linfócitos, por meio de kit para detecção de células CD3⁺ (Abcam plc, Cambridge, Reino Unido). A técnica consiste em desparafinar as lâminas na bateria de extração e hidratar em água a temperatura ambiente por 50 minutos. As lâminas são colocadas na cubeta para imersão no tampão e é então adicionada a solução Tween. Na sequência levadas para panela de pressão (Pascal) e após 40 minutos retiradas e deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos. As lâminas são lavadas na torneira com o jato de pressão leve e bloqueadas com H₂O₂ por 20 minutos. Enxaguadas com água e em seguida secas. Passado o Pap Pen e após pingado o Protein-Block (etapa para bloquear as proteínas inespecíficas). Levadas a estufa por 1 hora a 37°C. Escorrido o reagente da lâmina. Pingado o anticorpo anti-CD3, pingado o diluidor de anticorpo e levado a geladeira por 18 horas. Lavado em PBS 3 a 4 x, pingado o Pickture Max (Solução B) e mantido em 30 minutos em temperatura ambiente, lavado novamente em PBS 3 a 4x, pingado o Pickture Max (Solução B) e lavado em PBS. Após este processo, revelado no DAB e contracorado com hematoxilina-eosina. Após a preparação, as lâminas foram estudadas por patologista que classificou o grau de infiltrado por linfócitos em fraco, moderado ou intenso.

Amostras de tecido pulmonar também foram preparadas para análise de microscopia eletrônica. Imediatamente após a coleta, o tecido era colocado em frasco contendo o fixador glutaraldeído 3% preparado em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) e mantido a 4 °C por 3 horas. Logo após, o glutaraldeído era retirado, e as amostras fixadas em tetróxido de ósmio 1%

preparado em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3), sendo mantidas a 4 °C por 2 horas. O próximo passo era lavá-las em solução salina 0,9% contendo 1,78% de sacarose (pH 7,4), deixando-as até o dia seguinte em acetato de uranila 0,5% com 13,3% de sacarose (4 °C). A desidratação era feita em série crescente de etanol: 70% (2X – 10 min), 95% (2X – 15 min), etanol absoluto (4X – 15 min) e óxido de propileno (2X – 15 min). Depois era feita a infiltração com uma mistura de óxido de propileno e resina Araldite (Huntsman, São Paulo, Brasil) na proporção de 1:1 e os frascos ficavam em um girador elétrico por 210 minutos. A seguir, a mistura era desprezada, substituída por resina Araldite pura, e os frascos eram colocados em estufa a 40 °C por 1 hora. Os fragmentos eram, então, emblocados em moldes flexíveis de silicone contendo resina Araldite e deixados por 48 horas em estufa a 60 °C para polimerização.

Os blocos eram cortados em ultramicrotomo, modelo Ultracut (Leica, Viena, Áustria) e os cortes (60 a 70 nm de espessura) eram colocados em telas de cobre 200 mesh (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, EUA). Estas eram contrastadas com acetato de uranila 5% (Sigma, St Louis, EUA) por 30 minutos a temperatura ambiente, lavadas com água destilada e, a seguir, contrastadas com citrato de chumbo (Sigma, St Louis, EUA) por 20 minutos. Após nova lavagem com água destilada, as telas eram secadas com papel de filtro. As telas foram examinadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo Tecnai 10 (Philips, Amsterdã, Holanda) a procura de alterações estruturais que demonstrassem a presença de processo inflamatório ou morte celular. As Figuras 10,11,12,13 e 14 ilustram os achados na microscopia eletrônica.

Figura 10. Foto de Microscopia Eletrônica (3700x) demonstrando a ultra-estrutura com integridade da membrana basal. Seta A: membrana basal; Seta B: fibras colágenas; Seta C: Pneumócito tipo I.

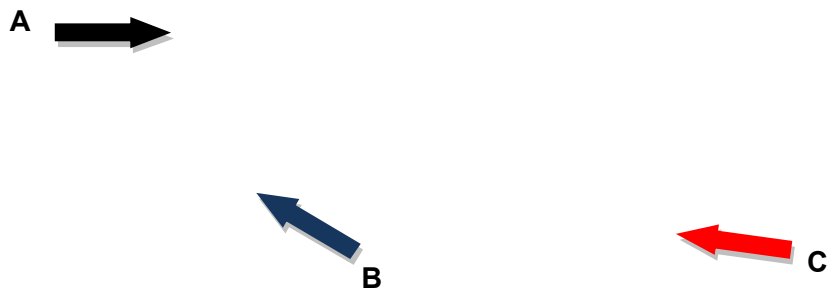


Figura 11. Foto de Microscopia Eletrônica (2250x) demonstrando a ultra-estrutura alvéolo capilar. Seta A: Leucócito; Seta B: Endotélio; Seta C: Hemácia; Seta D: Pneumócito tipo I; Seta E: Luz Alveolar.

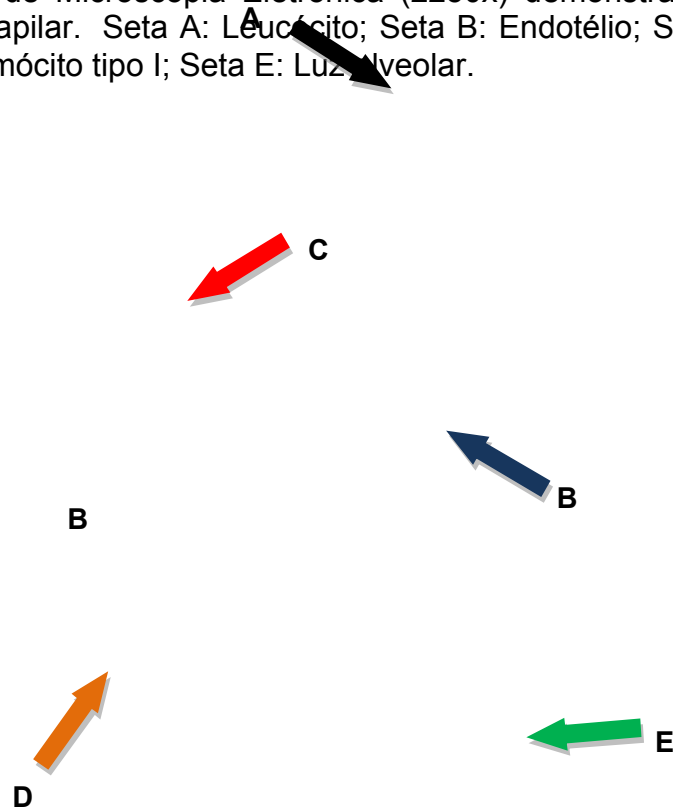


Figura 12. Foto de Microscopia Eletrônica (3700x) demonstrando a presença de células inflamatórias. Seta A: Macrófago; Seta B: Luz vascular.

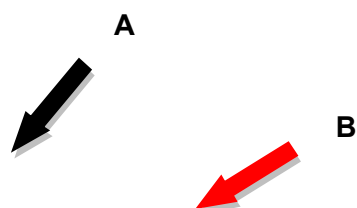


Figura 13. Foto Microscopia Eletrônica (3700x) Pneumócito tipo II de características normais. Seta A: Pneumócito tipo II; Seta B: Surfactante; Seta C: Núcleo com cromatina de distribuição normal.

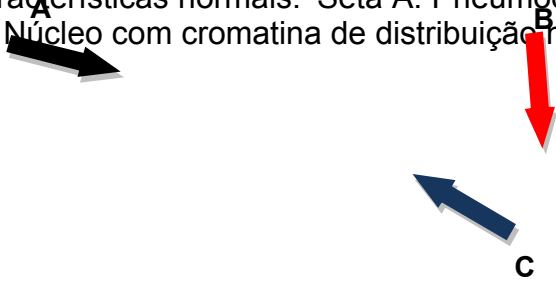


Figura 14. Foto de Microscopia Eletrônica (6200x) Pneumócito tipo II de características apoptóticas. Seta A: Pneumócito tipo II; Seta B: Surfactante; Seta C: Núcleo com sinais de apoptose.



4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva de todas as variáveis do estudo, aplicando dois testes de normalidade da amostra (Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk). As variáveis contínuas com distribuição normal são relatadas na forma de média $\pm$ desvio-padrão e as com distribuição não normal, na forma de mediana $\pm$ intervalo interquartil. As variáveis qualitativas são relatadas através de suas frequências e porcentagens.

Para as características demográficas relacionadas aos doadores, aplicamos apenas a análise descritiva. Segundo o desenho do estudo, cada doador tem um pulmão em cada um dos dois grupos testados, de tal forma que cada órgão tem seu respectivo controle, diminuindo bastante o eventual impacto das variáveis demográficas do doador sobre o resultado do experimento.

Para análise comparativa entre os grupos, realizamos essencialmente 3 tipos de análise:

1. Para a análise da diferença entre médias de medidas entre os dois grupos de estratégia de preservação (inter-grupos): aplicamos o teste T-pareado para a maioria das variáveis, exceto para aquelas que não passaram no teste de normalidade. Para essas, aplicamos o teste não paramétrico de Wilcoxon.

2. Para a análise da diferença entre médias de medidas entre os dois grupos de estratégia de preservação que evoluem ao longo do tempo (como na avaliação da microscopia ótica e para) foram realizadas análises de variância (ANOVA) de duplo fator (tempo e modo de preservação) com medidas repetidas.

3. Para as variáveis qualitativas em tabelas de 2x2 foi utilizado o teste do qui-quadrado ou exato de Fischer quando o valor esperado foi menor que 5. Em tabelas maiores que 2x2 foi utilizado o teste de verossimilhança devido ao valor esperado ser, em todos os casos, menor do que 5.

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software SPSS versão 18.0, com intervalo de confiança de 95% e nível de significância em 0,05.

5 RESULTADOS

As captações ocorreram de dezembro de 2009 a agosto de 2010, totalizando sete casos incluídos no protocolo e na análise. Os seguintes resultados foram obtidos: idade média de 53,86 anos ($\pm 16,7$); sexo 4 homens (57,1%) e 3 mulheres (42,8%); causa do óbito: acidente vascular cerebral hemorrágico (AVCh) em 5 doadores e trauma crânio encefálico (TCE) em 2 casos; motivo da recusa ao transplante: gasometria pré captação insatisfatória (PaO_2 inferior a 300 mmHg colhida com FiO_2 de 100% e PEEP de 5 cmH₂O) em 6 casos e em 1 caso presença de contusão pulmonar homogênea entre os dois lados. A Tabela 1 mostra características demográficas dos doadores bem como valores da gasometria pré captação e tempo de ventilação mecânica. Em quatro casos o lado submetido ao ECMO-tópico foi o lado direito (57,1%) e em 3 casos o lado ECMO-tópico foi a esquerda (42,9%).

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas dos doadores

Doadores	
Sexo:	
Masculino*	4(57,1%)
Feminino*	3(42,8%)
Idade (anos) ⁺	53,86 (±16,7)
Ventilação Mecânica (dias) [#]	4,86 (±3,93)
PaO ₂ (mmHg) ⁺	192,2 (±92,2)
PCO ₂ (mmHg) ⁺	33,1 (±9,6)
pH	7,3 (±0,2)
Causa do Óbito:	
AVCh*	5 (71,4%)
TCE*	2 (28,6%)
Motivo da Recusa para Transplante:	
PaO ₂ pré < 300mmHg ⁺⁺	6 (85,7%)
Contusão Bilateral*	1 (14,3%)
Lado Submetido ao ECMO-tópico:	
Direito*	4 (57,1%)
Esquerdo*	3 (42,9%)

NOTA: As variáveis contínuas estão expressas em média (± desvio padrão) e as variáveis categóricas estão expressas pelo seu número absoluto (porcentagem do total).

* Em número de casos.

[#] Tempo que o doador ficou intubado em ventilação mecânica.

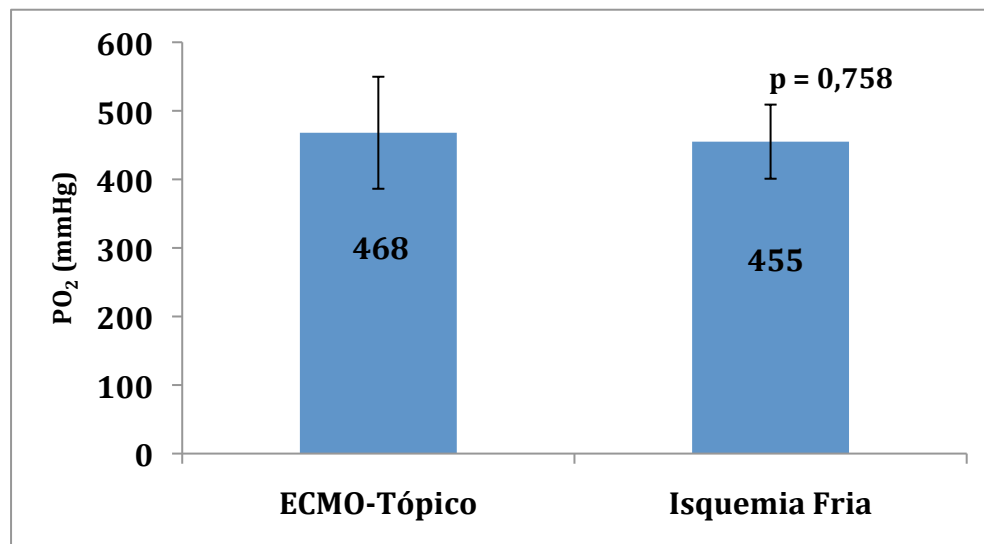
⁺ Valores obtidos em gasometria arterial colhida com FiO₂ 100% e PEEP 5 cmH₂O pré captação.

5.1 AVALIAÇÃO FUNCIONAL

A capacidade de oxigenação medida durante a reperfusão pela PaO₂ média dos pulmões preservados pela ECMO-tópico foi de 468,00 mmHg (±81,69 mmHg). Nos pulmões preservados pela isquemia fria PaO₂ média foi

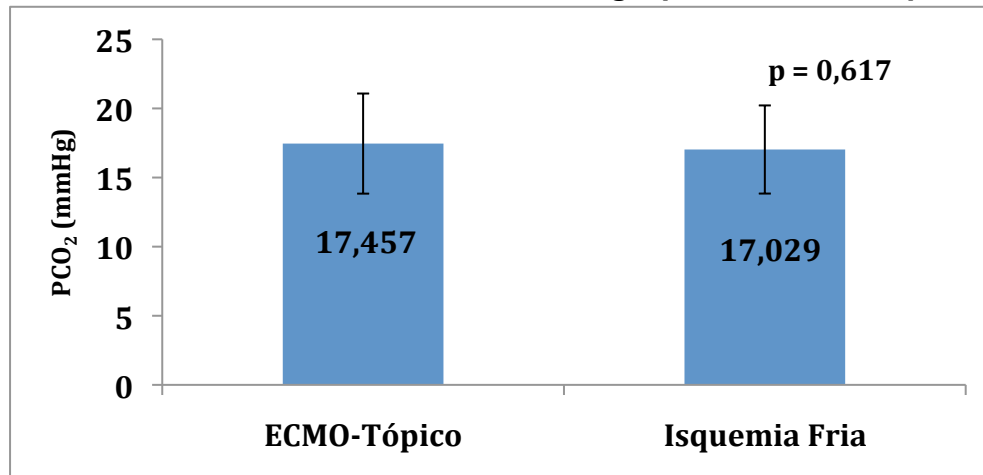
de 455,86 mmHg ($\pm 54,05$ mmHg). Não houve diferença significativa ($p=0,758$) entre os grupos quanto à capacidade de oxigenação dos pulmões após a reperfusão.

Gráfico 1 – Capacidade de oxigenação (PO_2) dos pulmões no final da reperfusão.



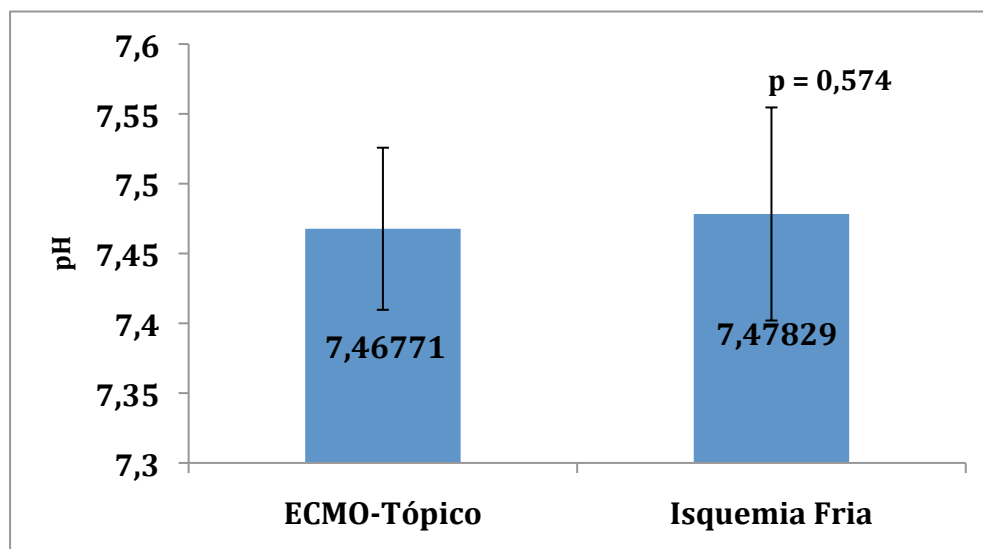
NOTA: As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

A PCO_2 média obtida na gasometria dos pulmões preservados pela ECMO-tópico foi de 17,457mmHg ($\pm 3,62$ mmHg). Nos pulmões preservados pela isquemia fria a PCO_2 média foi de 17,02mmHg ($\pm 3,18$ mmHg). Não houve diferença significativa ($p=0,617$).

Gráfico 2 – PCO₂ média obtida em cada grupo ao final da reperfusão

NOTA: As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

O pH médio dosado na gasometria dos pulmões preservados pela ECMO-tópico foi de 7,46 ($\pm 0,05$) e nos pulmões preservados pela isquemia fria o pH médio foi de 7,47 ($\pm 0,07$ mmHg) ($p=0,574$).

Gráfico 3 – pH médio obtido em cada pulmão ao final da reperfusão.

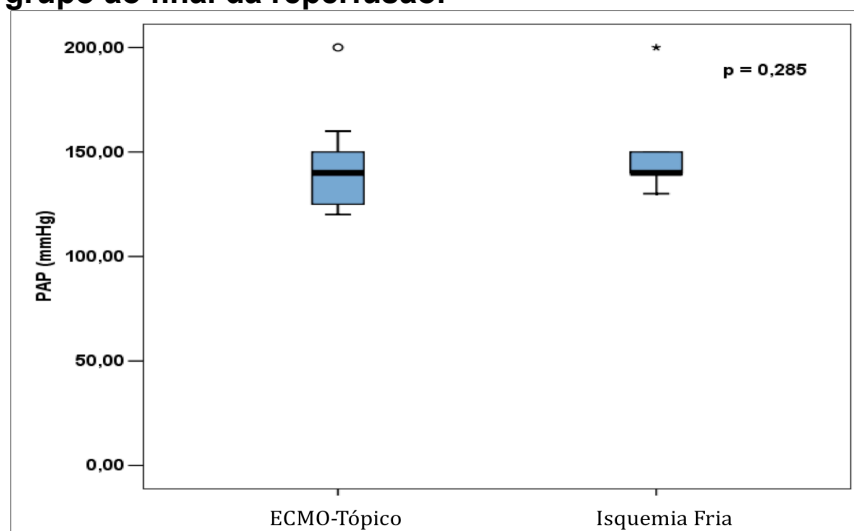
NOTA: As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

Encontramos na gasometria do sistema colhida após passagem no circuito para comprovar a capacidade de desoxigenação uma PaO_2 média de 91,94 ($\pm 24,45$).

5.2 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

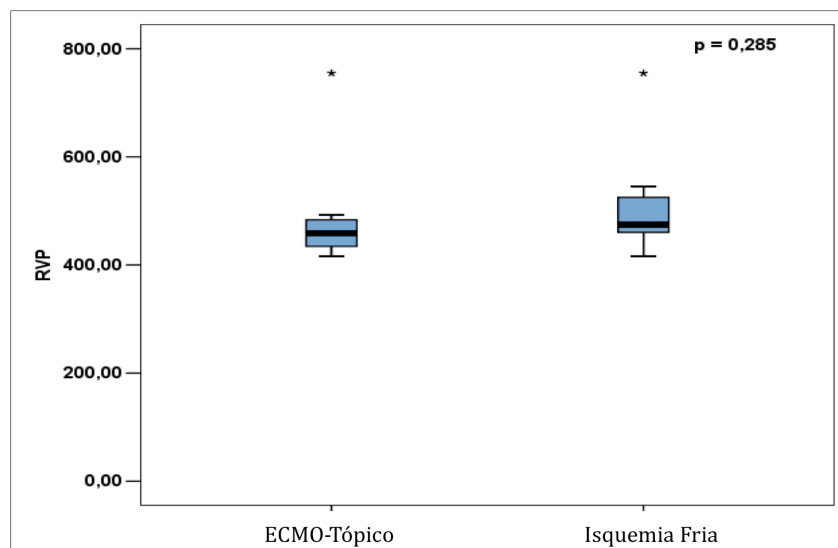
Das variáveis estudadas, a pressão de artéria pulmonar (PAP) e a resistência vascular pulmonar (RVP) não tiveram distribuição normal. Por isso, seus valores foram expressos como mediana (intervalo interquartil). A mediana da PAP dos pulmões ECMO-tópico foi de 140,00mmHg (120 – 160) e no grupo isquemia fria a mediana foi 140mmHg (140 – 150); essa diferença não foi significativa em teste não paramétrico (Wilcoxon) ($p=0,285$).

Gráfico 4 – Pressão de Artéria Pulmonar (PAP) mediana obtida em cada grupo ao final da reperfusão.



A mediana da RVP no grupo ECMO-tópico foi de 459,00 dina.s.cm⁻⁵ (432,43 — 492,30) e no grupo isquemia fria a mediana foi de 474,50 dina.s.cm⁻⁵ (459,01 — 545,45); essa diferença não foi significativa em teste não paramétrico com o mesmo p anterior ($p=0,285$).

Gráfico 5 – Resistência vascular (RVP) mediana obtida em cada pulmão ao final da reperfusão.



5.3 VARIAÇÃO DE PESO

Para a análise estatística da diferença entre médias obtidas da variação de peso entre grupos ao longo do tempo dos 3 tempos foi realizada ANOVA de duplo fator com medidas repetidas obtendo resultado não significativo.

Gráfico 6 – Comparação do peso medido entre grupos ao longo do tempo (Fator Grupo).

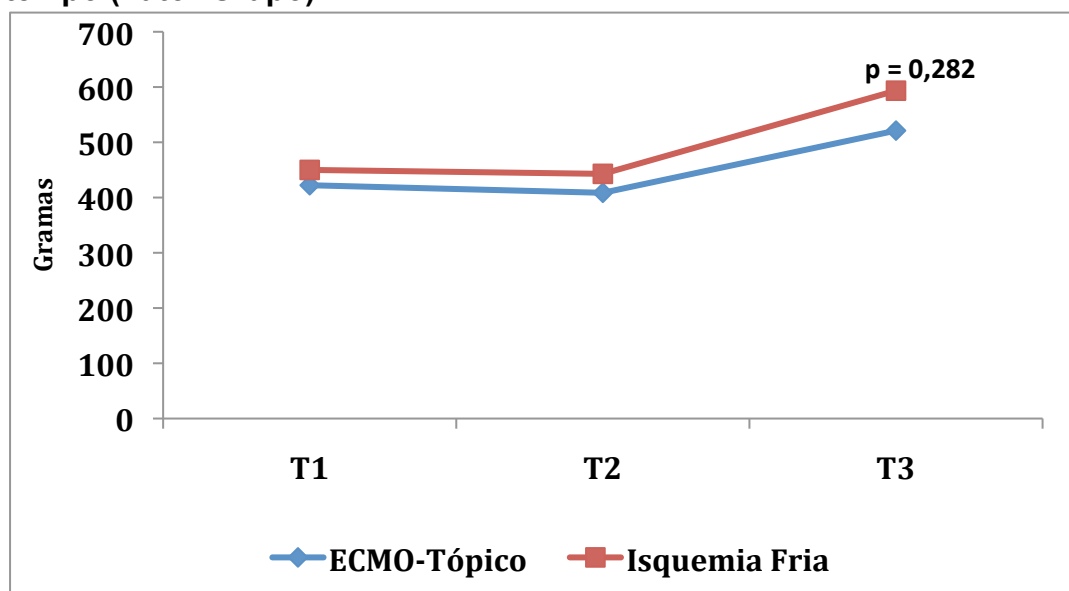
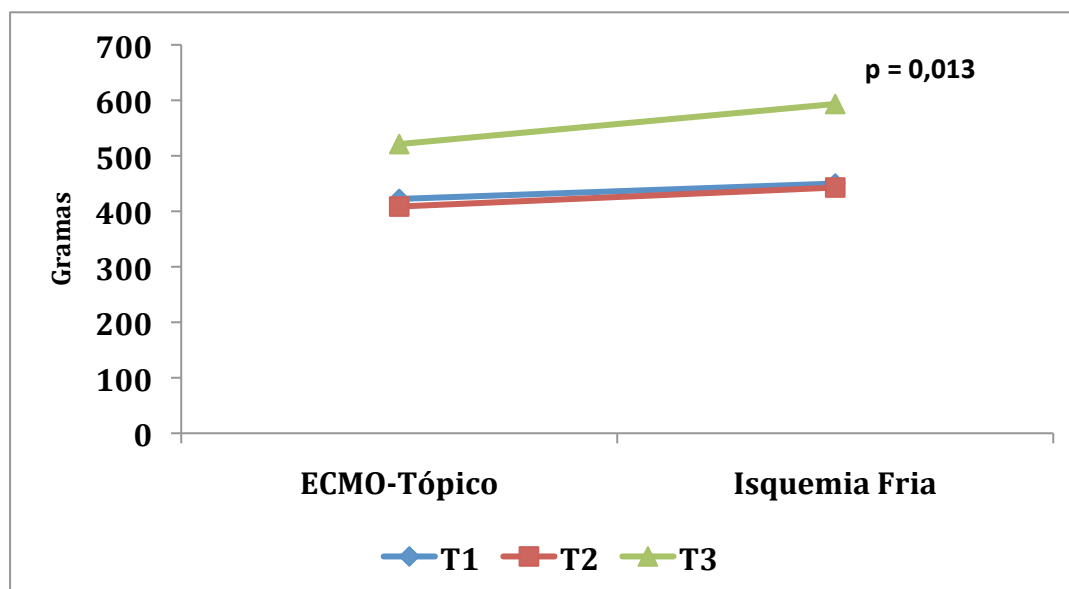


Gráfico 7 – Comparação do peso medido ao longo do tempo entre os dois grupos (Fator Tempo).

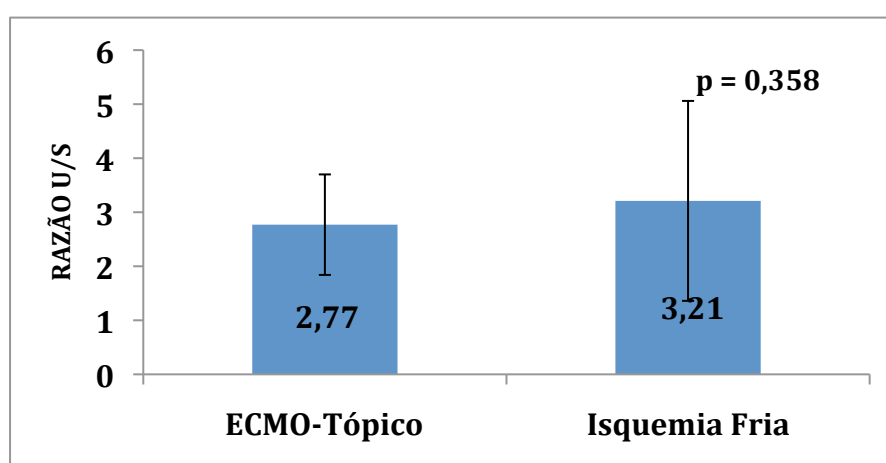


A interação entre grupos para o peso encontrado calculada pela ANOVA apresenta como resultado a interação entre $p = 0,346$, demonstrando a ausência de interação tempo x método de preservação.

5.4 RAZÃO PESO ÚMIDO-PESO SECO

A razão entre o peso úmido e o peso seco, considerada de distribuição normal, foi em média $2,77(\pm 0,93)$ e $3,21 (\pm 1,85)$ nos grupos ECMO-tópico e isquemia fria, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,358$).

Gráfico 8 – Razão peso úmido-peso seco média encontrada em cada grupo.



NOTA: As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

Os resultados funcionais estão compilados e resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Comparação funcional entre a preservação com ECMO-tópico e com Isquemia Fria.

	ECMO tópico	Isquemia fria	
Variável estudada	Valor de p		
Capacidade de Oxigenação ¹	468,00 (±81,69)	455,86 (±54,05)	0,758
PAP ² (mmHg)	140,00 (120 – 160)	140 (140 – 150);	0,285
RVP ³ (dina.s.cm ⁻⁵)	459,00 (432,43 — 492,30)	474,50(459,01 — 545,45)	0,285
PU/PS ⁴	2,77 (± 0,93)	3,21	0,358

NOTA: Os valores estão expressos como média (± desvio padrão), exceto a variável RVP, cujos valores estão expressos como mediana (intervalo interquartil).

¹Expressa como a média da PaO₂ em mmHg.

² PAP= pressão de artéria pulmonar

³ RVP = resistência vascular pulmonar

⁴ PU/PS = razão peso úmido-peso seco

5.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

5.5.1 Microscopia ótica

O Escore de Lesão Pulmonar (ELP) médio foi calculado para cada um dos tempos biopsiados. O ELP do tempo 1 (antes da captação), realizado para garantir a homogeneidade entre os lados, foi de 6,285 (±4,029) no grupo ECMO-tópico e 7,571 (±4,429) no grupo isquemia fria. Na biópsia realizada no tempo 2 (realizada após período de preservação, mas antes da reperfusão *ex vivo* que pode interferir na avaliação da preservação) o ELP médio foi de 8,714 (±4,785) no grupo ECMO-tópico e 7,714 (±5,089) no grupo isquemia fria. Para o tempo 3 após reperfusão (tempo final) sendo 9,571 (±4,503) e 7,857 (±6,121) nos grupos ECMO-tópico e isquemia fria, respectivamente.

Para a análise estatística da diferença entre médias obtidas de ELP entre grupos ao longo do tempo dos 3 tempos foi realizada ANOVA de duplo fator com medidas repetidas obtendo resultado não significante $p=0,531$.

Gráfico 9 – Comparação do Escore de Lesão Pulmonar (ELP) entre grupos ao longo do tempo (Fator Grupo).

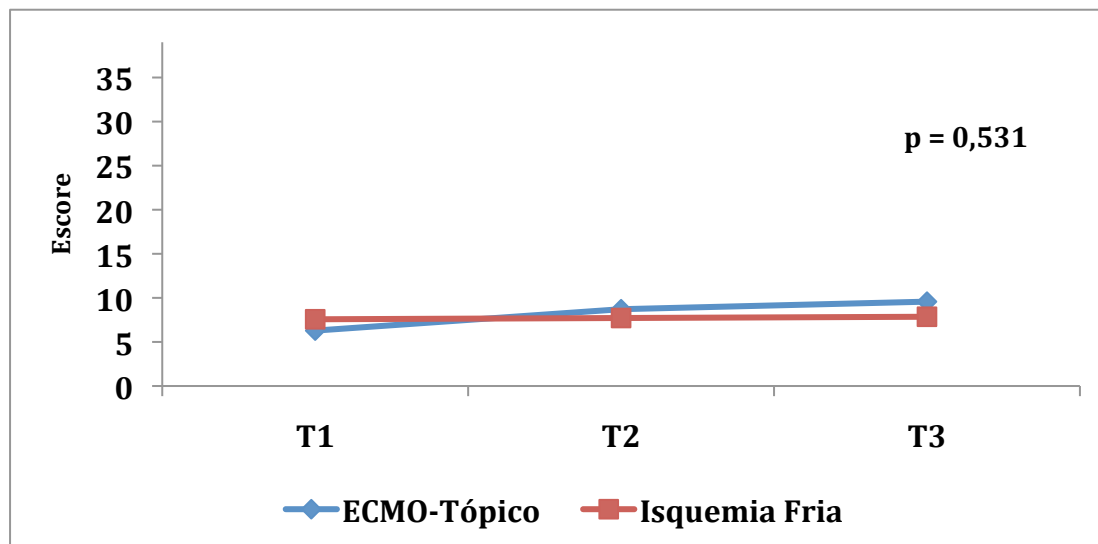
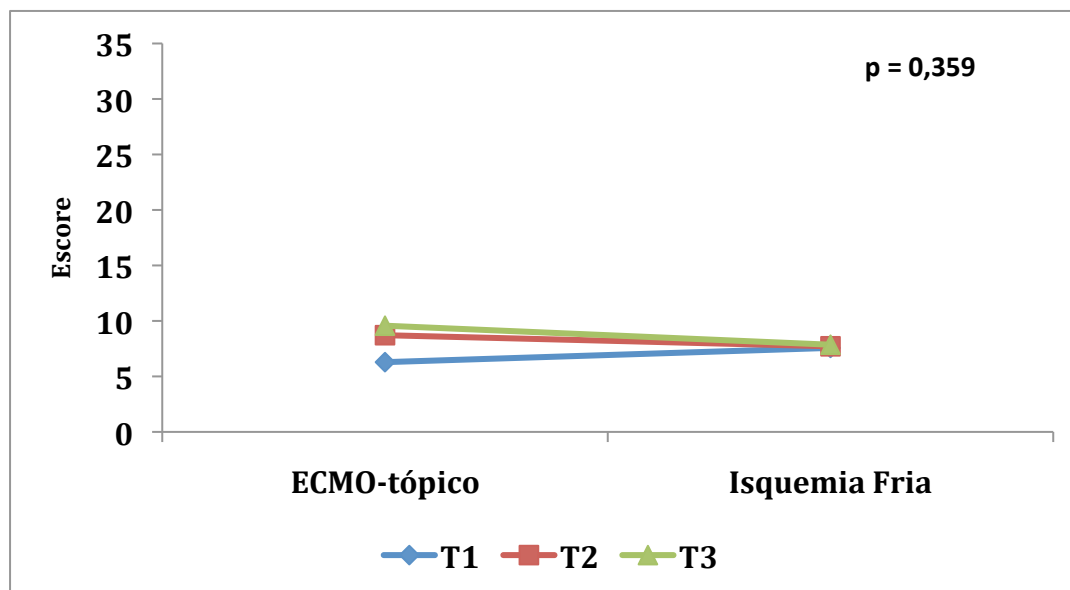


Gráfico 10 – Comparação do Escore de Lesão Pulmonar (ELP) ao longo do tempo entre grupos (Fator Tempo).



Já a interação entre tempo x método de preservação calculada pela ANOVA para o escore de lesão pulmonar apresenta como resultado $p=0,554$, significando ausência de interação.

5.5.2 Contagem de Células Apoptóticas (TUNEL)

O número de células apoptóticas identificadas pela reação TUNEL no tecido pulmonar colhido nos três tempos foi determinado pela contagem em dez campos. A contagem média do tempo 1 antes da captação, foi de 16,71($\pm 2,545$) no grupo ECMO-tópico e 18,57 ($\pm 5,118$) no grupo isquemia fria. Na biópsia realizada no tempo 2, após período de preservação, a contagem média foi de 20,71 ($\pm 5,843$) no grupo ECMO-tópico e 17,57 ($\pm 3,014$) no grupo isquemia fria. Para o tempo 3, após reperfusão, o resultado encontrado foi 25,00 ($\pm 9,34$) e 24,86 ($\pm 10,374$) nos grupos ECMO-tópico e isquemia fria, respectivamente. A análise estatística da diferença entre médias obtidas na contagem de células apoptóticas entre grupos ao longo do tempo dos 3 tempos foi realizada através de ANOVA de duplo fator com medidas repetidas, o resultado obtido foi não significante ($p=0,803$).

Gráfico 11 – Comparação da contagem de células apoptóticas entre grupos ao longo do tempo (Fator Grupo).

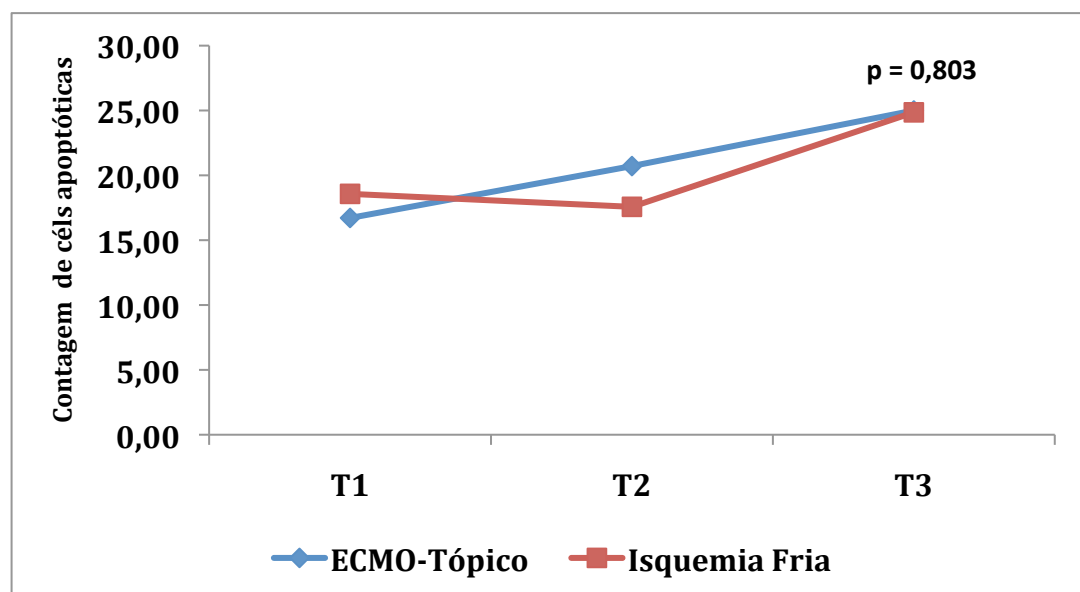
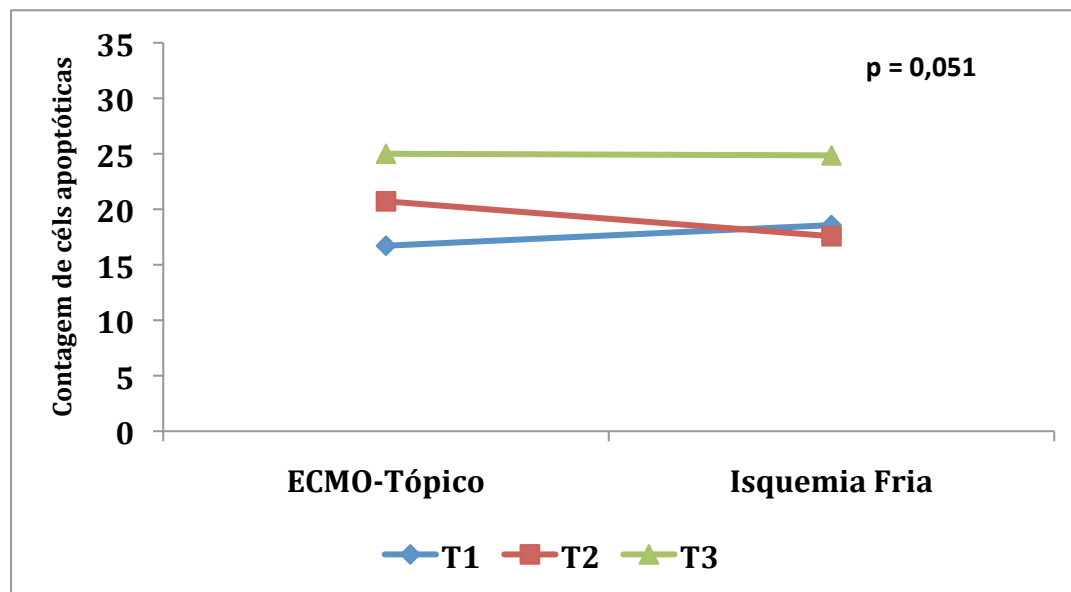


Gráfico 12 – Comparação da contagem de células apoptóticas ao longo do tempo entre grupos (Fator Tempo).

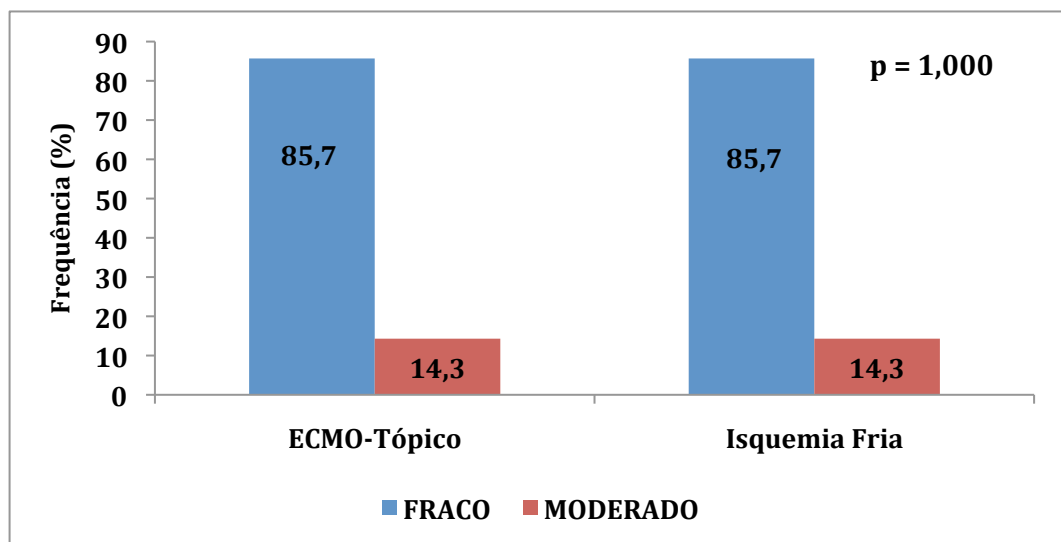


Para a ANOVA da contagem de células apoptóticas a interação entre calculada apresenta como resultado $p = 0,691$, demonstrando a ausência de interação tempo x método de preservação.

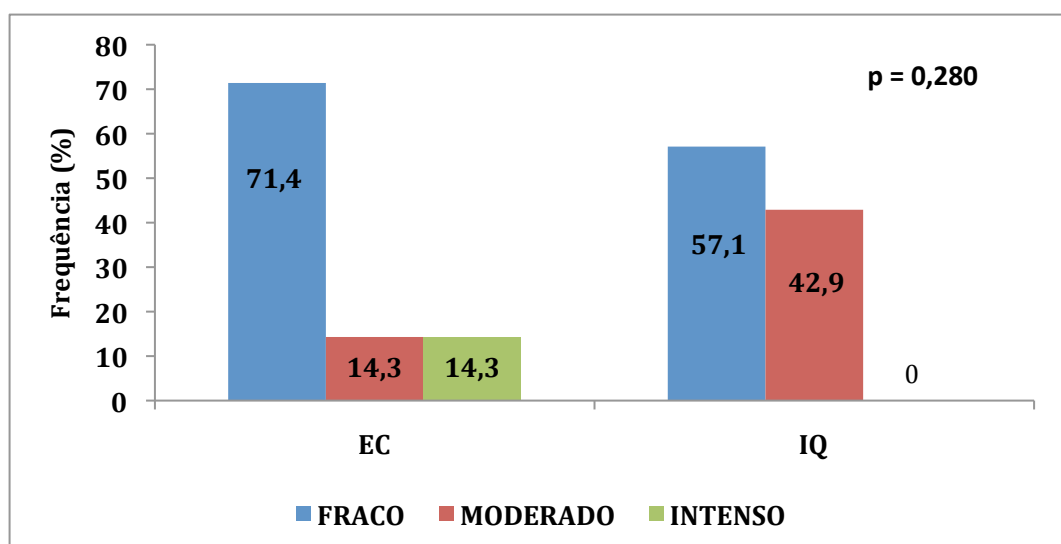
5.5.3 Avaliação do infiltrado de Células CD3+

O grau de inflamação tecidual foi estudado através da detecção da presença de células inflamatórias no tecido linfócitos, por meio de kit para detecção de células CD3+.

No tempo 1 o grupo ECMO-tópico demonstrou grau de infiltrado inflamatório considerado fraco em 85,7% e moderado em 14,3% das lâminas avaliadas. O resultado foi igual, fraco em 85,7% e moderado em 14,3%, no grupo isquemia fria nesse mesmo tempo ($p=1,000$).

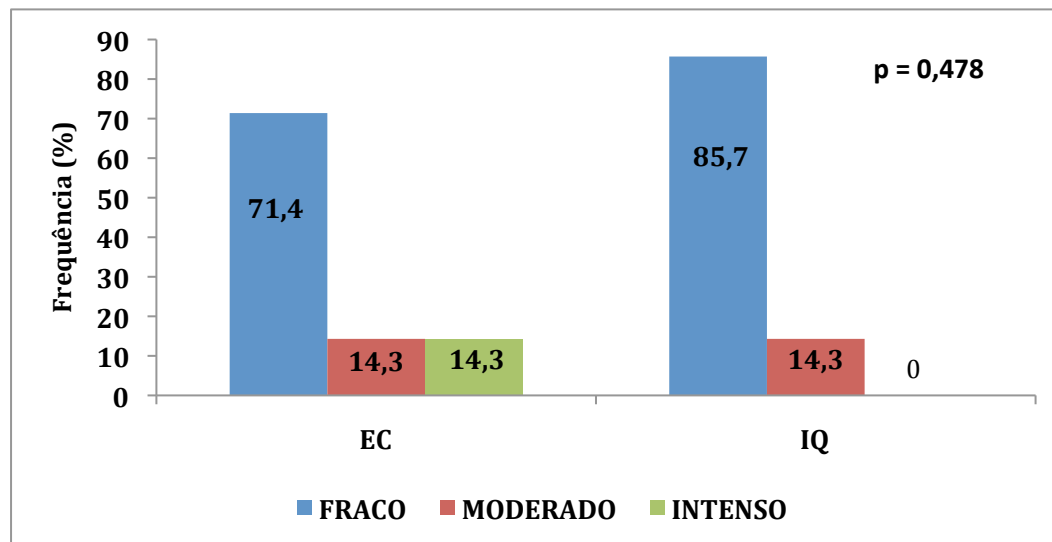
Gráfico 13 – Comparação da intensidade de células CD3+ no Tempo 1.

Para o Tempo 2 os resultados para o grupo ECMO-tópico foram fraco em 71,4%, moderado em 14,3% e intenso em 14,3% das lâminas avaliadas. Já os resultados para o grupo isquemia fria foram, fraco em 57,1% e moderado em 42,9%, ($p=0,280$).

Gráfico 14 – Comparação da intensidade de células CD3+ no Tempo 2.

No Tempo 3 o grupo ECMO-tópico foram apresentou infiltrado inflamatório considerado fraco em 71,4%, moderado em 14,3% e intenso em 14,3% das lâminas avaliadas. No grupo isquemia fria foram, fraco em 85,7% e moderado em 14,3%, ($p=0,478$).

Gráfico 15 – Comparação da intensidade de células CD3+ no Tempo 3.



5.5.4 Microscopia eletrônica

A Microscopia eletrônica foi utilizada para avaliação de alterações ultra-estruturais decorrentes do período de isquemia-reperfusão. Os achados foram semelhantes nos dois grupos entre os tempos comparados. As lesões identificadas foram a presença de células com características de apoptose e alterações na barreira alvéolo-capilar. Todavia, a grande quantidade de artefatos e a pequena quantidade de alterações encontradas não permitiram a utilização de um escore para comparação estatística entre os grupos.

6 DISCUSSÃO

Apesar de utilizada como forma de preservação pelo grupo da Universidade de Lund na Suécia, a técnica do ECMO-tópico nunca foi testada para comprovar sua eficácia ou mesmo sua segurança. Em algumas publicações deste grupo O ECMO-tópico aparece associado ao sistema *ex vivo*⁹⁶. Por outro lado, não existe menção ao ECMO-tópico por nenhum outro grupo, incluindo o grupo Canadense, que em suas diversas publicações com o sistema *ex vivo* optou por não realizar o ECMO-tópico, mesmo no período pós-reperfusão, conforme recomendado pelo Prof. Steen.

Este trabalho é o primeiro a estudar de forma comparativa a técnica ECMO-tópico com a forma mais utilizada para a preservação pulmonar para transplante: a isquemia fria.

6.1 CASUÍSTICA

A opção pela utilização de pulmões de doadores humanos em um estudo experimental foi motivada pela intenção de que o estudo fosse representativo da realidade clínica do transplante pulmonar. Além da dificuldade na obtenção de doadores outro grande problema é apontado: a grande variabilidade encontrada entre os doadores. Isso poderia levar a resultados discrepantes visto que, para um trabalho desse porte de complexidade e custo, o número de casos para estudo deve ser mínimo.

Por este motivo idealizamos um estudo experimental em que pudéssemos reduzir a essa variabilidade inter casos. Para tanto pensamos em um estudo pareado. Isto foi possível pela separação do bloco pulmonar em direito e esquerdo permitindo que cada um dos lados pudesse ser preservado por técnica diferente (lado ECMO-tópico x lado Isquemia Fria), mas mantendo o pareamento no momento da análise.

A idéia do bloco pulmonar separado e posterior re-conexão foi testado em casos piloto se mostrando factível e sem incorrer em piora funcional para o pulmão ou em interferência na reperfusão¹⁰⁵.

Se comparados com os dados do estado de São Paulo publicados por Pêgo-Fernandes et al. veremos que os sete casos representam de forma adequada a população de doadores de órgãos e tecidos encontrados no Brasil. A idade média dos doadores em nossa casuística foi 53,86 anos ($\pm 16,7$) sendo ligeiramente maior que a descrita por Pêgo-Fernandes et al: $37,47 \pm 16,16$ anos (16 dias-82 anos). A distribuição dos sexos foi semelhante com maioria no sexo masculino, 4 homens (57,1%) e 3 mulheres (42,8%) em nossa casuística contra 198 homens (56,9%) e 150 mulheres (43,1%) no encontrado por Pêgo-Fernandes et al⁵.

Dentre as causas de morte encefálica de forma semelhante ao encontrado na prática clínica, o acidente vascular cerebral hemorrágico (AVCh) foi a principal causa do óbito, ocorrendo em 5 doadores (71,42%); em segundo lugar trauma crânio encefálico (TCE) em 2 (28,57%). Na casuística de Pêgo-Fernandes a distribuição das causas foi a seguinte: AVC e

Hemorragia Subaracnóidea em 51,4% e TCE em 34,2%, ferimento por arma de fogo em 5,7% entre outras causas.

6.2 AVALIAÇÃO FUNCIONAL

Consideramos a capacidade de oxigenação como o parâmetro mais importante da avaliação funcional, isto porque estudos prévios já demonstraram que os valores de PO_2 correspondem de forma mais fidedigna à qualidade da preservação pulmonar, quando comparado aos outros parâmetros como anátomo-patológicos ou radiológicos⁸⁶. Os valores obtidos no estudo demonstram que tanto a capacidade de oxigenação quanto a capacidade de troca de CO_2 foram semelhantes nos dois grupos sem diferença estatística.

Comparado aos trabalhos que avaliaram a recuperação pulmonar no sistema *ex vivo* observamos da mesma maneira um incremento considerável na capacidade de oxigenação; o valor médio do PO_2 da gasometria pré captação saltou de 192,2 mmHg ($\pm 92,2$) para 468,00 mmHg ($\pm 81,69$) após 1 hora de perfusão.

Em estudo de Wyerup et al., também com pulmões de doadores rejeitados para transplante, submetidos ao sistema *ex vivo* a PO_2 média pré captação era de 186,9 mmHg, chegando a 384,3 mmHg ao fim da reperfusão¹³. Em outro estudo publicado por um grupo americano da Universidade da Carolina do Norte a diferença entre as médias de PO_2 pré-captação e pós-reperfusão foi menos expressiva, de 304,6 mmHg para 383,8

mmHg, porém, mesmo assim permanece clara a melhora da função pulmonar com o uso do sistema *ex vivo*⁹³.

Estas comparações demonstram não só que o sistema *ex vivo* por nós adaptado é similar aos modelos já publicados, mas também exemplifica a importante propriedade do sistema *ex vivo* em recuperar a capacidade de oxigenação desses órgãos.

Como o pulmão por sua função de troca gasosa interfere diretamente na homeostase do organismo, em especial no equilíbrio ácido-básico, coletamos dados do pH da solução para comparação. Os dados por nós encontrados não apresentaram diferenças entre os dois modos de preservação. O pH médio dosado na gasometria de todos pulmões independentemente da forma de preservação foi de 7,465; apesar deste valor obtido no sistema ser ligeiramente mais básico do que a faixa de normalidade, acreditamos que não isso não determinou nenhum prejuízo ao órgão.

Outro parâmetro estudado como na avaliação funcional foram as medidas hemodinâmicas de pressão de artéria pulmonar e resistência vascular pulmonar. Cypel et al. sugerem que a manutenção de baixas pressões de artéria pulmonar são fundamentais para prevenir que o órgão seja lesado durante a realização da perfusão no modelo *ex vivo*. Este autor também sugere que a incapacidade de se manter um fluxo pulmonar adequado com PA baixas constitui um forte indicativo de que estes pulmões já estejam fortemente lesados podendo ser irrecuperáveis⁹⁸. Em nosso estudo não houve diferença entre a PA ou RVP entre cada um dos grupos

testado. Salienta-se que alguns dos determinantes da pressão da artéria pulmonar não estão presentes no modelo de perfusão ex vivo (por exemplo, a denervação pulmonar) todavia, o impacto disso ainda é desconhecido.

6.3 VARIAÇÃO DE PESO E RAZÃO PESO ÚMIDO-PESO SECO

Outro parâmetro freqüentemente utilizado na literatura para avaliação da preservação pulmonar é a variação de peso como forma de medida do edema pulmonar. O processo de isquemia-reperfusão por ocasionar o aumento da permeabilidade vascular e ruptura da barreira alvéolo-capilar acaba por determinar a retenção de água. O grau de edema acaba por ser inversamente proporcional à qualidade da preservação³³. A forma mais simples de estudo é a simples medição da variação do peso. Todavia, por sofrer influência de outros fatores como hemorragia alveolar pode ter sua validade contestada. Também é considerada pouco sensível por não detectar graus mais leves de edema.

Em nosso estudo, a variação do peso após o período de reperfusão foi semelhante nos dois grupos. Após 8 horas de ECMO tópico houve uma ínfima redução na mediana do peso (provavelmente devido ao extravasamento de sangue durante o armazenamento). Já no grupo isquemia fria, observamos um aumento, porém, também mínimo na mediana encontrada.

Já no momento após reperfusão ocorreu ganho de peso demonstrando a ocorrência de edema de reperfusão. Esse achado é

importante por corroborar os achados de outros autores de que mesmo com o uso da solução de Steen a reperfusão no sistema *ex vivo* está sujeita a algum grau de edema que pode inviabilizar reperfusões de maior duração. Entretanto, Cypel et al. conseguiram obter melhores resultados, mesmo com tempo de preservação prolongado, pelo uso de "retorno venoso fechado" por meio de uma cânula em formato de funil suturada diretamente no "cuff" atrial. Dessa forma eles conseguiram manter uma pressão de átrio diferente de zero alterando assim a RVP e evitando a formação de edema⁹⁷.

A razão peso úmido-peso seco corresponde a uma forma mais fidedigna de medida da quantidade de água presente nos espécimes estudados ao final de todo período de isquemia-reperfusão. Quanto maior o seu valor maior o edema acumulado. A razão U/S foi semelhante nos dois grupos.

Através destes parâmetros demonstramos que a formação de edema ocorreu de maneira semelhante em ambos os grupos.

6.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A avaliação histológica do tecido pulmonar submetido a isquemia-reperfusão demonstra alterações bem caracterizadas que podem ser adequadamente estudadas na microscopia de luz convencional conforme já descrito em estudos prévios³⁴.

Duas limitações se impõem em nosso estudo quando analisamos as alterações histológicas em pulmões submetidos a preservação pulmonar: a primeira é que o grau das alterações encontradas na histologia não

apresenta correspondência linear ao resultado funcional; a segunda é a presença de lesões pulmonares ocorridas no período pré-captção, dentre estas, a condição pró-inflamatória ocorrida com a morte encefálica é determinante de alterações importantes no doador e que refletem diretamente sobre o tecido pulmonar²⁴.

Apesar destas limitações o estudo histológico pode, com uma boa margem de segurança, estudar a qualidade da preservação pulmonar, principalmente se realizado de forma comparativa.

Conforme metodologia já aplicada por nosso grupo anteriormente foi realizada uma análise semi-quantitativa por patologista que classificava os achados padronizados (Infiltrado septal, Infiltrado pleural, Infiltrado peribronquiolar, Fibrose peribronquiolar etc.) em ausente, leve, moderado ou intenso¹⁰³. Dessa análise foi calculado um escore que então foi utilizado para comparar os grupos estudados. Em nosso estudo os escores de lesão obtidos por cada grupo foi semelhante tanto após o período de isquemia fria quanto após a reperfusão.

A detecção de células apoptóticas foi realizada feita com técnica de imunohistoquímica *TUNEL – in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling*. Outros autores como Fischer et al. já estudaram esta técnica em pulmões humanos transplantados¹⁰⁶. Estes encontraram aumento significativo do número de células apoptóticas após 2 horas de reperfusão do enxerto. Um estudo com contagem de células apoptóticas, usando um modelo de transplante pulmonar em ratos, demonstrou uma correlação estatisticamente significativa entre o percentual de células necróticas e a piora da função do enxerto,

estimada pela PO_2 , após o implante. Em nossa pesquisa a contagem de células apoptóticas encontrada foi equivalente nos dois modos de preservação estudados.

A presença e magnitude do infiltrado inflamatório foi avaliada através de imunohistoquímica com quantificação do infiltrado linfocitário. Cypel et al. utilizaram metodologia semelhante também pesquisando células CD3+ em trabalho comparando a preservação através de reperfusão contínua no sistema *ex vivo* por 12h com preservação por isquemia fria¹⁰⁸. Os resultados demonstraram que pulmões preservados com reperfusão apresentavam menor infiltrado de linfócitos, denotando menor intensidade de processo inflamatório e por conseqüente melhor preservação. Em nosso trabalho a imunohistoquímica foi utilizada para marcar células CD3+ em tecidos parafinados, os resultados encontrados nos dois grupos foi semelhante tanto no período pós-preservação quanto pós-reperfusão.

A microscopia eletrônica foi utilizada para a avaliação da ultra-estrutura pulmonar, foram encontradas alterações características da agressão pulmonar pela isquemia e reperfusão como aparecimento de células inflamatórias e sinais de apoptose celular, contudo a escassez dessas alterações não permitiu a avaliação quantitativa ou semi-quantitativa. Por essa avaliação qualitativa da microscopia eletrônica o examinador não identificou diferenças entre os grupos.

6.5 LIMITAÇÕES

As principais limitações de nosso estudo são:

- O pequeno número de casos: devido a dificuldade de obtenção de doadores o número de casos é reduzido;
- Agressão pulmonar pré-captção: como se trata de estudo comparativo esta variável foi minimizada pelo pareamento de cada paciente em lado ECMO-tópico e lado isquemia fria;
- A não realização do transplante: Sabe-se que a agressão da reperfusão quanto o órgão é efetivamente transplantado é maior, muito por causa de alterações imunológicas do receptor. Todavia, acreditamos a que a reperfusão *ex vivo* é um bom substituto ao transplante experimental como modelo de estudo.
- Baixo tempo de reperfusão: sabe-se que em maiores tempos de reperfusão, acima de 60 minutos, acentuam-se as alterações da isquemia-reperfusão. Todavia, como ao final de uma hora o sistema encontra-se estável, podendo-se realizar as avaliações funcionais; e para evitar que fatores inerentes ao modelo *ex vivo* pudessem dificultar a análise, optamos por curto período de reperfusão.

6.6 CONCLUSÕES

6.6.1 O Sistema Ex vivo

Mesmo não sendo o objetivo principal de nosso trabalho ficou claro que o sistema *ex vivo* apresenta inequívoco potencial para uso clínico por suas características relacionadas à recuperação de doadores atualmente não aceitos para transplante pulmonar. A reperfusão no sistema permitiu substancial melhora na capacidade de oxigenação desses pulmões estudados. Seis dos sete pulmões estudados apresentavam baixa capacidade de oxigenação e após a reperfusão os seis apresentavam melhora substancial atravessando a nota de corte de 300 mmHg de PO₂. O condicionamento pulmonar parece ser a principal utilidade do sistema *ex vivo* e deve ser mais explorada em estudos futuros.

6.6.2 Modelo pulmão dividido

O modelo de pulmão dividido aplicado no sistema *ex vivo* se mostrou confiável e útil para estudo em pulmões humanos, sobretudo por minimizar grande heterogeneidade encontrada quando trabalha-se com pulmões humanos doados. Sua aplicação em estudos futuros pode ser de grande contribuição.

6.6.3 ECMO-tópico X Isquemia fria

A Isquemia fria após perfusão com solução de preservação gelada representa hoje a forma mais utilizada pelos grupos de transplante pulmonar devido a facilidade de execução e resultado satisfatório. O ECMO-Tópico, técnica mais complexa e dispendiosa, não se mostrou superior a isquemia

fria para preservação pulmonar por 8 horas em todos os parâmetros avaliados em nosso estudo.

7 REFERÊNCIAS

1) Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Stehlik J, Hertz MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult_Lung_and_Heart-LungTransplant Report- 2011. J Heart Lung Transplant. 2011 Oct;30(10):1104-22.

2) Governo do Estado de São Paulo. Central de Transplantes da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Dados estatísticos. Produção de transplantes. Available from: <http://ctxses.saude.sp.gov.br/>. Accessed in 2008 (Jun 16).

3) Costa da Silva F Jr, Afonso JE Jr, Pêgo-Fernandes PM, Caramori ML, Jatene FB. São Paulo lung transplantation waiting list: patient characteristics and predictors of death. Transplant Proc. 2009 Apr;41(3):927-31.

4) Punch JD, Hayes DH, LaPorte FB, McBride V, Seely MS. Organ donation and utilization in the United States, 1996-2005. Am J Transplant. 2007;7 (5 Pt 2):1327-38.

5) Fernandes PM, Samano MN, Junqueira JJ, Waisberg DR, Noletto GS, Jatene FB. Lung donor profile in the State of São Paulo, Brazil, in 2006 .J Bras Pneumol. 2008 Jul;34(7):497-505.

6) Aigner C, Winkler G, Jaksch P, Seebacher G, Lang G, Taghavi S, et al. Extended donor criteria for lung transplantation--a clinical reality. Eur J Cardiothorac Surg. 2005;27(5):757-61.

7) De Perrot M, Keshavjee S. Lung preservation. Curr Opin Organ Transplant 2001;6:223–30.

8) Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med* 2000 Dec;136(6):427-40.

9) Van Raemdonck D. Thoracic organs: current preservation technology and future prospects; part 1: lung. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Apr;15(2):150-5.

10) Steen S, Kimblad PO, Sjöberg T, Lindberg L, Ingemansson R, Massa G. Safe lung preservation for twenty-four hours with Perfadex. *Ann Thorac Surg* 1994; 57:450–457.

11) Xiong L, Legagneux J, Wassef M, Oubenaïssa A, Détruit H, Mouas C, et al. Protective effects of Celsior in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18:320–327.

12) Steen S, Ingemansson R, Budrikis A, Bolys R, Roscher R, Sjöberg T. Successful transplantation of lungs topically cooled in the non-heart-beating donor for 6 hours. *Ann Thorac Surg* 1997; 63: 345–51.

13) Wierup P, Haraldsson A, Nilsson F, Pierre L, Scherstén H, Silverborn M, et al. Ex vivo evaluation of nonacceptable donor lungs. *Ann Thorac Surg* 2006;81:460–6. 9.

14) Steen S, Sjöberg T, Ingemansson R, Lindberg L. Efficacy of topical cooling in lung preservation: is a reappraisal due? *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 1657–63.

15) Steen S, Liao Q, Wierup P, Bolys R, Pierre L, Sjöberg T. Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment ex vivo. *Ann Thorac Surg* 2003;76:244–52.

16) Hossein S. Organ transplantation: from myth to reality. *J Invest Surg* 2001;14:135–8.

17) Bergan A. Ancient myth, modern reality. A brief history of transplantation. *J Biocommun* 1997;24(4):2–9.

18) Linden PK. History of Solid Organ Transplantation and Organ Donation. *Crit Care Clin*. 2009;25: 165–184.

19) Carel A. The operative technique for vascular anastomoses and transplantation of viscera. *Lyon Med.* 1902;98:859-61.

20) Carrel A, Guthrie CC. Functions of a transplanted kidney. *Science* 1905;22:473.

21) Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, et al. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *JAMA* 1956;160:277–82.

22) Starzl TE, Koep LJ, Halgrimson CG, et al. Fifteen years of clinical liver transplantation. *Gastroenterology* 1979;77(2):375–88.

23) Barnard CN. Human cardiac transplantation. An evaluation of the first two operations performed at the Groote Schuur Hospital, Cape Town. *Am J Cardiol.* 1968 Oct;22(4):584-96.

24) Orens JB, Garrity ER. General overview of lung transplantation and review of organ allocation. *Proc Am Thorac Soc.* 2009; 6: 13-9.

25) Rutherford RM, Lordan JL, Fisher AJ, Corris PA. Historical overview of lung and heart-lung transplantation. In: Lynch JP, Ross DJ, editores. *Lung and Heart-lung Transplantation*. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 1-20.

26) Hardy JD, Webb WR, Dalton ML Jr, Walker GR Jr. Lung Homotransplantation in Man. *JAMA.* 1963 Dec 21;186:1065-74.

27) Kahan BD. Forty years of publication of transplantation proceedings--the second decade: the cyclosporine revolution. *Transplant Proc.* 2009 Jun;41(5):1423-37.

28) Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA, Todd TRJ, Ginsber RJ, Goldberg M et al. Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987; 93: 173-81.

29) Brazilian lung transplantation: an expanding universe. Pêgo-Fernandes PM, Mariani AW. *Sao Paulo Med J.* 2009 Nov;127(6):327-8.

30) Registro Brasileiro de Transplantes – Ano XVI, no 4, Jan/Dez 2010 [Associação Brasileira de Transplante de Órgãos]. São Paulo, 2011.

31) Carter YM, Gelman AE, Kreisel D. Pathogenesis, management and consequences of primary graft dysfunction. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2008; 20: 165-72.

32) Mulligan MS. Primary graft dysfunction following lung transplantation: pathogenesis and impact on early and late outcomes. In: Lynch JP, Ross DJ, editores. *Lung and Heart-lung Transplantation*. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 437-64.

33) de Perrot M, Keshavjee S. Lung preservation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 16: 300-8.

34) de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 490-511.

35) Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med.* 2000; 136: 427-40.

36) Egan TM. Lung preservation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1992; 4(2): 83-9.

37) Kirk AJB, Colquhoun IW, Dark JH. Lung preservation: a review of current practice and future directions. *Ann Thorac Surg.* 1993; 56: 990-1000.

38) Hardesty RL, Griffith BP. Autoperfusion of the heart and lungs for preservation during distant procurement. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987; 93: 11-8.

39) Yacoub MH, Khaghani A, Banner N, Tajkarimi S, Fitzgerald M. Distant organ procurement for heart and lung transplantation. *Transplant Proc.* 1989; 21: 2548-50.

40) Collins GM, Bravo-Shugartman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transplantation: initial perfusion and 30 hours ice storage. *Lancet.* 1969; 2: 1219-22.

41) Sack SA, Petritsch SH, Kaufman JJ. Canine kidney preservation using a new perfusate. *Lancet*. 1973; 1: 1024-8.

42) Baldwin JC, Frist WH, Starkey TD, Harjula A, Starnes VA, Stinson EB, et al. Distant graft procurement for combined heart and lung transplantation using pulmonary artery flush and simple topical hypothermia for graft preservation. *Ann Thorac Surg*. 1987; 43: 670-3.

43) Locke TJ, Hooper TL, Flecknell PA, McGregor CGA. Preservation of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1988; 96: 789-95.

44) Veith FJ, Crane R, Torres M, Colon I, Hagstrom JWC, Pinsker K, et al. Effective preservation and transportation of lung transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1976; 72: 97-105.

45) Haverich A, Scott WC, Jamieson SW. Twenty years of lung preservation: a review. *Heart Transplant*. 1985; 4: 234-40.

46) Starkey TD, Sakakibara N, Hagberg RC, Tazelaar HD, Baldwin JC, Jamieson SW. Successful six-hour cardiopulmonary preservation with simple hypothermic crystalloid flush. *J Heart Transplant*. 1986; 5: 291-7.

47) Bresticker MA, LoCicero J III, Oba J, Greene R. Successful extended lung preservation with UW solution. *Transplantation*. 1992; 54: 780-4.

48) Kawahara K, Kobayashi S, Takahashi T, Nakamura A, Yamamoto S, Tagawa M, et al. Efficacy of UW solution for canine lung preservation. *Transplant Proc*. 1993; 25: 1599-600.

49) Unruh H, Hoppensack M, Oppenheimer L. Vascular properties of canine lungs perfused with Euro-Collins solution and prostacyclin. *Ann Thorac Surg*. 1990; 49: 292-8.

50) Hachida M, Hoon DSB, Morton DL. A comparison of solutions for lung preservation using pulmonary alveolar type II cell viability. *Ann Thorac Surg*. 1988; 45: 643-6.

51) Fujimura S, Handa M, Kondo T, Ichinose T, Shiraishi Y, Nakada T. Successful 48-hour simple hypothermic preservation of canine lung transplants. *Transplant Proc.* 1987; 19: 1334-6.

52) Keshavjee SH, Yamazaki F, Yokomise H, Cardoso PF, Mullen JBM, Slutsky AS, et al. The role of dextran 40 and potassium in extended hypothermic lung preservation for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992; 103: 314-25.

53) Maccherini M, Keshavjee SH, Slutsky AS, Patterson GA, Edelson JD. The effect of low-potassium dextran versus Euro-Collins solution for preservation of isolated type II pneumocytes. *Transplantation.* 1991; 52: 621-6.

54) Date H, Matsumura A, Manchester JK, Obo H, Lima O, Cooper JM, et al. Evaluation of lung metabolism during successful twenty-four-hour canine lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993; 105: 480-91.

55) Kelly RF, Murar J, Hong Z, Nelson DP, Hong F, Varghese A, et al. Low-potassium-dextran lung preservation solution reduces reactive oxygen species production. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75: 1705-10.

56) Strüber M, Hohlfeld JM, Fraund S, Kim P, Warnecke G, Haverich A. Low-potassium-dextran solution ameliorates reperfusion injury of the lung and protects surfactant function. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000; 120: 566-72.

57) Soccia PM, Gasche Y, Pache JC, Schneuwly O, Slosman DO, Morel DR, et al. Matrix metalloproteinases correlate with alveolar-capillary permeability alteration in lung ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.* 2000; 70: 998-1005.

58) Hausen B, Beuke M, Schroeder F, Poets CF, Hewitt C, DelRossi AJ, et al. In vivo measurement of lung preservation solution efficacy: comparison of LPD, UW, EC and low K⁺-EC following short and extended ischemia. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1997; 12: 771-9.

59) Chien S, Zhang F, Niu W, Tseng MT, Gray L Jr. Comparison of University of Wisconsin, Euro-Collins, low-potassium dextran, and krebs-henseleit solutions for hypothermic lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000; 119: 921-30.

60) Steen S, Kimblad PO, Sjöberg T, Lindberg L, Ingemansson R, Massa G. Safe lung preservation for twenty-four hours with Perfadex. *Ann Thorac Surg.* 1994; 57: 450-7.

61) Müller C, Fürst H, Reichenspurner H, Briegel J, Groh J, Reichart B, et al. Lung procurement by low-potassium dextran and the effect on preservation injury. *Transplantation.* 1999; 68: 1139-43.

62) Fischer S, Matte-Martyn A, de Perrot M, Waddell TK, Sekine Y, Hutcheon M, et al. Low-potassium dextran preservation solution improves lung function after human lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 121: 594-6.

63) Strüber M, Wilhelmi M, Harringer W, Niedermeyer J, Anssar M, Künsebeck A, et al. Flush perfusion with low-potassium dextran solution improves early graft function in clinical lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001; 19: 190-4.

64) Rabanal JM, Ibañez AM, Mons R, Gonzalez AM, Carbajo M, Ortega J, et al. Influence of preservation solution on early lung function (Euro-Collins vs Perfadex). *Transplant Proc.* 2003; 35: 1938-9.

65) Oto T, Griffiths AP, Rosenfeldt F, Levvey BJ, Williams TJ, Snell GI. Early outcomes comparing Perfadex, Euro-Collins, and Papworth solutions in lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2006; 82: 1842-8.

66) Aziz TM, Pillay TM, Corris PA, Forty J, Hilton CJ, Hasan A, et al. Perfadex for clinical lung procurement: is it an advance? *Ann Thorac Surg.* 2003; 75: 990-5.

67) Nath DS, Walter AR, Johnson AC, Radosevich DM, Prekker ME, Herrington CS, et al. Does Perfadex affects outcomes in clinical lung transplantation? *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24: 2243-8.

68) Reignier J, Mazmanian M, Chapelier A, Alberici G, Menasche P, Weiss M, et al. Evaluation of a new preservation solution: Celsior in the isolated rat lung – Paris-Sud University Lung Transplantation Group. *J Heart Lung Transplant*. 1995; 14: 601-4.

69) Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, Sakamaki Y, Starnes VA, Barr ML. A comparison of the new preservation solution to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury. *Transplantation*. 1999; 67: 152-5.

70) Wittwer T, Wahlers T, Fehrenbach A, Elki S, Haverich A. Improvement of pulmonary preservation with Celsior and Perfadex: impact of storage time on early post-ischemic lung function. *J Heart Lung Transplant*. 1999; 18: 1198-1201.

71) Wittwer T, Fehrenbach A, Meyer D, Brandes H, Albes J, Richter J, et al. Retrograde flush perfusion with low-potassium solutions for improvement of experimental pulmonary preservation. *J Heart Lung Transplant*. 2000; 19: 976-83.

72) Franke UFW, Wittwer T, Fehrenbach A, Sandhaus T, Pfeifer F, Mueller T, et al. Pig lung transplantation using extracellular type preservation solutions. *J Heart Lung Transplant*. 2002; 21:58.

73) Sommer SP, Warnecke G, Hohlfeld JM, Gohrbandt B, Niedermeyer J, Kofidis T, et al. Pulmonary preservation with LPD and Celsior solution in porcine lung transplantation after 24h of cold ischemia. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004; 26: 151-7.

74) Baldwin JC, Frist WH, Starkey TD, et al. Distant graft procurement for combined heart and lung transplantation using a pulmonary artery flush and simple topical hypothermia for graft Preservation. *Ann Thorac Surg* 1987;43:670-3.

75) Strom TB, Carpenter CB. Prostaglandin as an effective antirejection therapy in rat renal allograft recipients. *Trans-plantation* 1983;35:279-80.

76) Jones G, Hurley JV. The effect of prostacyclin in the adhesion of leucocytes to injured vascular endothelium. *J Pathol* 1984;142:51-9.

77) Fantone JC, Funkel SL, Ward PA, Zurier RB. Suppression by prostaglandin E₁ of vascular permeability induced by vasoactive inflammatory mediators. *J Immunol* 1980;125: 2591-6.

78) Novick RJ, Reid KR, Denning L, Duplan J, Menkis AH, McKenzie FN. Prolonged preservation of canine lung allografts: the role of prostaglandins. *Ann Thorac Surg* 1991;51:853-9. 57.

79) Hooper TL, Fetherston GJ, Flecknell PA, Dark JH, McGregor CGA. The use of a prostacyclin analog, iloprost, as an adjunct to pulmonary preservation with Euro-Collins solution. *Transplantation* 1990;49:495-9.

80) Bonser RS, Fragomeni LS, Jamieson SW, et al. Effects of prostacyclin E₁ in twelve-hour lung preservation. *J Heart Lung Transplant* 1991;10:310-6.

81) Hooper TL, Thomson DS, Jones MT, et al. Amelioration of lung ischemic injury with prostacyclin. *Transplantation* 1990;49:1031-5.

82) Jurmann HJ, Dammenhayn L, Schafers H-J, Wahlers T, Fieguth H-G, Haverich A. Prostacyclin as an additive to single crystalloid flush: improved pulmonary preservation in heart-lung transplantation. *Transplant Proc* 1987;19: 41034.

83) Owen S, Hooper T, Thomson D, et al. Methylprednisolone and prostacyclin in lung preservation. *Thorax* 1989;44:850P.

84) Hall TS, Borkon AM, Gurtner GC, et al. Improved static lung preservation with corticosteroids and hypothermia. *J Heart Transplant* 1988;7:348-52.

85) Connaughton PJ, Bahuth JJ, Lewis FJ. Lung ischemia up to six hours; influence of topical cooling in situ on subsequent pulmonary function. *Dis Chest* 1962;41:404-8.

86) Wang L-S, Yoshikawa K, Miyoshi S, et al. The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a simple ex vivo rabbit model used for functional assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:333-42.

87) Modry DL, Jirsch DW, Boehme G, et al. Hypothermic perfusion preservation of the isolated dog lung. *Ann Thorac Surg* 1973;16:583-97.

88) Stevens GH, Sanchez MM, Chappell GL. Enhancement of lung preservation by prevention of lung collapse. *J Surg Res* 1973;14:400-5.

89) Veith FJ. Preservation of the lung. *Transplant Proc* 1974;6: 323-8.

90) Blumenstock DA, Lempert N, Morgado F. Preservation of the canine lung in vitro for 24 hours with the use of hypothermia and hyperbaric oxygen. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1965;50:769-74.

91) Garzon AA, Cheng C, Pangan J, Karlson KE. Hypothermic hyperbaric lung preservation for twenty-four hours with replantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968;55:546-54.

92) Steen S, Sjöberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet*. 2001; 357: 825-9.

93) Egan TM, Haithcock JA, Nicotra WA, Koukoulis G, Inokawa H, Sevala M, et al. Ex vivo evaluation of human lungs for transplant suitability. *Ann Thorac Surg*. 2006; 81: 1205-13.

94) Yeung JC, Cypel M, Waddell TK, Raemdonck DV, Keshafjee S. Update on donor assessment, resuscitation and acceptance criteria, including novel techniques – non-heart-beating donor lung retrieval and ex vivo donor lung perfusion. *Thorac Surg Clin*. 2009; 19: 261-74.

95) Steen S, Ingemansson R, Eriksson L, Pierre L, Algotsson L, Wierup P, et al. First human transplantation of a nonacceptable donor lung after reconditioning ex vivo. *Ann Thorac Surg*. 2007; 83: 2191-5.

96) Ingemansson R, Eyjolfsson A, Mared L, Pierre L, Algotsson L, Ekmeahag B, et al. Clinical transplantation of initially rejected donor lungs after reconditioning ex vivo. *Ann Thorac Surg*. 2009; 87: 255-60.

97) Cypel M, Yeung JC, Hirayama S, Rubacha M, Fischer S, Anraku M, et al. Technique for prolonged normothermic ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. 2008; 27: 1319-25.

98) Cypel M, Yeung JC, de Perrot M, Karolak W, Chen F, Sato M, et al. Ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation – the HELP trial. *J Heart Lung Transplant*. 2010; 29(2S): S88.

99) Cypel M, Liu M, Rubacha M, Yeung JC, Hirayama S, Anraku M, et al. Functional repair of human donor lungs by IL-10 gene therapy. *Sci Transl Med*. 2009 Oct 28;1(4):4ra9.

100) Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, et al. Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med*. 2011 Apr 14;364(15):1431-40.

101) Pego-Fernandes PM, Medeiros IL, Mariani AW, Fernandes FG, Unterpertinger FV, Samano MN, et al. Perfusão pulmonar ex vivo: experiência nacional inicial. *J Bras Pneumol*. 2009; 35(11): 1107-11.

102) Pego-Fernandes PM, Medeiros IL, Mariani AW, Fernandes FG, Unterpertinger FV, Samano MN, et al. Ex vivo lung perfusion: early report of brazilian experience. *Transplant Proc*. 2010; 42: 440-3.

103) Pego-Fernandes PM, Mariani AW, Medeiros IL, Pereira AEA, Fernandes FG, Unterpertinger FV, et al. Avaliação e recondicionamento pulmonar ex vivo. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2010; 25(4): 441-6.

104) Medeiros IL, Pêgo-Fernandes PM, Mariani AW, Fernandes FG, do Vale Unterpertinger F, Canzian M, et al. Histologic and functional evaluation of lungs reconditioned by ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Nov 29. [Epub ahead of print]

105) Mariani AW, Medeiros IL, Pego-Fernandes PM, Fernandes FG, Unterpertinger FV, Fernandes LM, et al. Modelo experimental ex vivo com bloco pulmonar dividido. J Bras Pneumol. 2011; 37(6): 791-5.

106) Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM, Cardella JA, Cutz E, Edwards V, et al. Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation. Ann Surg. 2000; 231(3): 424-31.

107) Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, et al. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 162: 1932-9.

108) Cypel M, Rubacha M, Yeung J, Hirayama S, Torbicki K, Madonik M, et al. Normothermic ex vivo perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. Am J Transplant. 2009;9(10):2262-9.