

Arteiro Queiroz Menezes

Estudo de pulmões de ratos reperfundidos em um modelo experimental ex-vivo: comparação entre duas soluções de preservação (Perfadex® e Celsior®)

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade do Estado de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de: Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Menezes, Arteiro Queiroz

Estudo de pulmões de ratos reperfundidos em um modelo experimental ex-vivo :
comparação entre duas soluções de preservação (Perfadex® e Celsior®) / Arteiro
Queiroz Menezes. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Paulo Manuel Pêgo Fernandes.

Descritores: 1.Transplante de pulmão 2.Preservação de órgãos 3.Soluções para
preservação de órgãos 4.Modelos animais 5.Isquemia 6.Traumatismo por
reperfusão/mortalidade 7.Ratos

USP/FM/DBD-116/13

Dedicatória

Aos meus queridos pais Gilperes e Cêila pela presença em todos os momentos da minha vida e em todas as etapas da minha profissão. A vocês o meu Amor, a minha Ternura e a minha Gratidão.

Ao meu avô, Hermógenes Conceição Queiroz (in memorian), meu exemplo de Humildade, Caridade, Amizade, Trabalho e Altruísmo, com Amor e Saudade.

À minha esposa e companheira Janaína pelo seu amor, pelo seu carinho, pela sua compreensão e apoio em todos os momentos desta jornada.

Ao meu filho amado André Ângelo pelo imenso incentivo que me dá no seu sorriso, no seu olhar, no seu carinho e no seu abraço, para enfrentar os desafios e incertezas do caminho.

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes a minha gratidão pela confiança depositada e por ter me aberto os caminhos no INCOR para que eu pudesse realizar esse sonho. Muito obrigado professor.

Ao Prof. Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso pelo imenso auxílio, pelas palavras de estímulo e pelos ensinamentos. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Fábio Biscegli Jatene pelas palavras de incentivo em cada encontro pelos corredores do INCOR.

Às biólogas do LIM-61, Karina Andrighetti, Natália Nepomuceno e Liliane Ruiz, sem as quais a distância entre Manaus e São Paulo seria intransponível. Muito obrigado pela imensa ajuda.

Ao biólogo Aristides Tadeu Correia pelas análises estatísticas e todas as orientações na realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira pelas orientações metodológicas e pela sempre prestimosa atenção nos assuntos administrativos.

Ao Dr. Mauro Canzian, médico patologista, pelas análises histopatológicas e pela sua sempre cordial atenção.

À funcionária Sônia Sposito pela calorosa receptividade e prestimosa ajuda em todos os meus pedidos.

Às funcionárias Márcia Cristina Augusto, Eliana Ogata, Rosângela Monteiro e Roseli Oliveira Araújo pela ajuda com as tarefas administrativas.

Às funcionárias da Coordenação de Pós-Graduação Neusa Rodrigues Dini, Juliana Lattari Sobrinho e Eva Malheiros Guiss de Oliveira pela atenção, ajuda e orientação nos trâmites da pós-graduação.

Aos professores da pós-graduação, Prof. Dr. Moacyr Roberto Cuce Nobre e Prof. Dr. José Antônio Franchini Ramires, pela simpatia e cordialidade na transmissão de seus conhecimentos.

Ao Dr. Rogério Pazetti pelas orientações durante a fase experimental deste projeto.

Ao Prof. Dr. Gerson Suguiyama Nakagima pelo exemplo de dedicação e compromisso com o ensino médico.

Ao Prof. Dr. João Bosco Botelho pelo exemplo de liderança, obstinação e capacidade de agregar pessoas, buscando compartilhar as suas experiências e proporcionar a outros a oportunidade da pesquisa e do crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Cleinaldo Almeida Costa, que trilhou os mesmos caminhos e as mesmas distâncias, pelo seu grande exemplo e incentivo.

A Dra. Tatiana Minda Herculano Cattebeke pelo incentivo e apoio.

Ao Dr. André Luiz Almeida pelo companheirismo e incentivo.

Aos médicos gestores Dr. Raymison Monteiro de Souza, Dr. Ítalo Valle Cortez, Dr. Chang Chia Po, Dr. Júlio Mário de Melo e Lima, Dr. Fernando César Façanha Fonseca, Dr. Lourivaldo Rodrigues de Souza, Dr. Rubem Alves da Silva Júnior, Dr. Raul Antônio Antunes Ferreira, pela imensa compreensão e apoio nas minhas necessárias ausências.

Muitos são os meus agradecimentos, pois eu nunca conseguiria superar sozinho a distância, as cansativas viagens, as incertezas, a solidão, as minhas limitações e as minhas inexperiências.

Obrigado a todos.

“Não, não tenho caminho novo.

*O que tenho de novo
é o jeito de caminhar.”*

Thiago de Mello

Barreirinha, Amazonas, 1961

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Villhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**LISTA DE TABELAS****LISTA DE FIGURAS****LISTA DE GRÁFICOS****RESUMO****SUMMARY**

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	9
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1	Preservação pulmonar.....	12
3.1.1	Hipotermia.....	12
3.1.2	Perfusão anterógrada da artéria pulmonar.....	13
3.1.3	Perfusão retrógrada da artéria pulmonar.....	14
3.1.4	Temperatura da solução de preservação.....	15
3.1.5	Volume da solução de preservação.....	16
3.1.6	Pressão de infusão da solução de preservação.....	17
3.1.7	Insuflação e ventilação pulmonar durante preservação.....	17
3.1.8	Infusão de prostaglandinas.....	18
3.1.9	Soluções de preservação pulmonar.....	19
3.1.9.1	LPD-Glicose (Perfadex®).....	20
3.1.9.2	Celsior®.....	22
3.1.9.3	Estudos comparando Perfadex® e Celsior®.....	24
4	MÉTODOS.....	28
4.1	Animais e grupos.....	29
4.2	Extração do bloco cardiopulmonar e isquemia fria.....	30

4.3	Reperusão.....	33
4.4	Avaliação funcional.....	36
4.5	Avaliação anatomopatológica.....	38
4.6	Avaliação pela microscopia eletrônica de transmissão.....	38
4.7	Avaliação pelo método TUNEL.....	39
4.8	Análise estatística.....	40
4.8.1	Análise estatística descritiva.....	40
4.8.2	Análise estatística inferencial.....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Avaliação funcional pulmonar e mecânica ventilatória.....	42
5.1.1	Complacência pulmonar.....	42
5.1.2	Pressão de artéria pulmonar.....	45
5.1.3	Capacidade relativa de oxigenação.....	47
5.1.4	Peso do bloco cardiopulmonar ao longo da reperusão.....	50
5.1.5	Razão peso úmido/peso seco.....	52
5.2	Avaliação pela microscopia óptica.....	54
5.3	Avaliação pela microscopia eletrônica.....	60
5.4	Avaliação pelo método TUNEL.....	61
6	DISCUSSÃO.....	62
7	CONCLUSÃO.....	70
8	ANEXO.....	72
9	REFERÊNCIAS.....	74

Esta pesquisa recebeu subsídio financeiro

FAPESP – Auxílio Pesquisa Regular – Processo 07/53462-0

APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
CEC	Circulação extracorporeal
Cmpl	Complacência
CRO	Capacidade relativa de oxigenação
EUA	Estados Unidos da América
FR	Frequência respiratória
HE	Hematoxilina e eosina
IL-8	Interleucina 8
INCOR-HC-FMUSP	Instituto Nacional do Coração - Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LPD-Glicose	Low Potassium Dextran Glicose
MA	Massachusetts
Max ExpFl	Fluxo expiratório máximo
Max InsFl	Fluxo inspiratório máximo
PAP	Pressão de artéria pulmonar
PBS	Phosphate-buffered saline
PEEP	Positive end-expiratory pressure
RVP	Resistência vascular pulmonar
U/S	Peso úmido/peso seco
UW	University Wisconsin
VC	Volume corrente

	Pag.
Tabela 1. Composição do Celsior® e Perfadex®.....	7
Tabela 2. Comparações (média e erro padrão) das complacências pulmonares no tempo de isquemia de 6 horas.....	43
Tabela 3. Valores da significância verificados na análise patológica e comparação dos grupos submetidos às diferentes soluções de preservação após 6 horas de isquemia.....	57
Tabela 4. Valores da significância verificados na análise patológica e comparação dos grupos submetidos às diferentes soluções de preservação após 12 horas de isquemia.....	57
Tabela 5. Valores da significância verificados na análise patológica e comparação dos grupos submetidos aos diferentes tempos de isquemia.	58

	Pag.
Figura 1. Distribuição dos animais em grupos de acordo com o perfusato utilizado para a preservação e o tempo de isquemia.....	30
Figura 2. Canulação da artéria pulmonar através de ventriculotomia direita e perfusão pulmonar anterógrada com drenagem do efluente pela ventriculotomia esquerda.....	31
Figura 3. Extração do bloco cardiopulmonar em sentido craniocaudal.....	32
Figura 4. Sangue coletado e aquecido, circulando no aparelho de perfusão ex-vivo IL-2 (Isolated Perfused Rat or Guinea Pig Lung System) para preenchimento do sistema.....	33
Figura 5. Bloco cardiopulmonar adaptado ao aparelho de perfusão/ventilação pulmonar ex-vivo Harvard Apparatus IL-2.....	35
Figura 6. Esquema simplificado do circuito da perfusão pulmonar ex-vivo.....	36
Figura 7. Lâmina de parênquima pulmonar preservado com Perfadex® e submetido a isquemia por 6 horas (Hematoxilina-eosina, 200X).....	59
Figura 8. Lâmina de parênquima pulmonar preservado com solução salina e submetido a isquemia por 6 horas (Hematoxilina-eosina, 200x).....	59
Figura 9. Pneumócito apresentando tendência a agregação periférica da cromatina, compatível com processo apoptótico (Microscopia eletrônica de transmissão, 8900x).....	60
Figura 10. Imagem de microscopia de imunofluorescência (TUNEL) para avaliação de apoptose celular.....	61

	Pag.
Gráfico 1. Complacência pulmonar média ao longo da reperfusão no tempo de isquemia de 6 horas.....	43
Gráfico 2. Complacência pulmonar média ao longo da reperfusão no tempo de isquemia de 12 horas.....	44
Gráfico 3. Complacência pulmonar média nos tempos de isquemia de 6 e 12 horas	45
Gráfico 4. Pressão média de artéria pulmonar ao longo da reperfusão no tempo de isquemia de 6 horas.....	46
Gráfico 5. Pressão média de artéria pulmonar ao longo da reperfusão no tempo de isquemia de 12 horas.....	46
Gráfico 6. Pressão de artéria pulmonar nos tempos de isquemia de 6 e 12 horas.....	47
Gráfico 7. CRO média no tempo de isquemia de 6 horas.....	48
Gráfico 8. CRO média no tempo de isquemia de 12 horas.....	48
Gráfico 9. CRO média dos pulmões submetidos a 6 e 12 horas de isquemia.....	49
Gráfico 10. Peso médio do bloco cardiopulmonar ao longo da reperfusão no tempo de isquemia de 6 horas.....	50
Gráfico 11. Peso médio do bloco cardiopulmonar ao longo da reperfusão no tempo de isquemia de 12 horas.....	51
Gráfico 12. Peso médio do bloco cardiopulmonar dos pulmões submetidos a 6 e 12 horas de isquemia.....	51
Gráfico 13. Razão peso úmido/peso seco dos pulmões submetidos a 6 horas de isquemia.....	52
Gráfico 14. Razão peso úmido/peso seco dos pulmões submetidos a 12 horas de isquemia.....	53
Gráfico 15. Razão peso úmido/peso seco nos tempos de isquemia de 6 e 12 horas....	54
Gráfico 16. Comparação entre os grupos quanto à presença de edema alveolar no tempo de isquemia de 6 horas.....	55
Gráfico 17. Comparação entre os grupos quanto à presença de edema alveolar no tempo de isquemia de 12 horas.....	55
Gráfico 18. Comparação entre os grupos quanto à presença de edema alveolar nos tempos de isquemia de 6 e 12 horas.....	56

Resumo

MENEZES AQ. Estudo de pulmões de ratos reperfundidos em um modelo experimental ex-vivo: comparação entre duas soluções de preservação (Perfadex® e Celsior®) [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013, 85p.

INTRODUÇÃO: A lesão de isquemia-reperfusão continua sendo considerada a maior causa de mortalidade relacionada ao transplante de pulmão e sua gravidade é influenciada por diversos fatores, dentre eles, a preservação pulmonar. **OBJETIVO:** Comparar duas soluções de preservação pulmonar, Perfadex® e Celsior®, quanto a capacidade de preservação de tecido pulmonar isquêmico. **MÉTODOS:** Sessenta pulmões de ratos preservados com Perfadex®, Celsior® ou solução salina após períodos de isquemia hipotérmica de 6 ou 12 horas, foram reperfundidos com sangue homólogo em modelo experimental ex-vivo durante 60 minutos consecutivos. A cada 10 minutos os dados de gasometria, hematócrito, mecânica ventilatória, hemodinâmica e peso do bloco cardiopulmonar foram registrados. Ao final da reperfusão o pulmão esquerdo foi pesado e acondicionado por 48h a 70°C para obtenção da razão peso úmido/peso seco, bem como amostras de tecido pulmonar foram retiradas para histopatologia, microscopia eletrônica e TUNEL. A análise estatística incluiu a comparação entre as soluções e os tempos de isquemia, utilizando ANOVA e Kruskal-Wallis. O nível de significância foi de 5%. **RESULTADOS:** A comparação entre as complacências de pulmões preservados com Celsior® e Perfadex® nos tempos de isquemia de 6 e 12 horas não apresentou significância estatística ($p=0,161$ e $p=0,316$, respectivamente). Os pulmões submetidos a 6 horas de isquemia apresentaram complacência pulmonar superior aos de 12 horas (Perfadex® $p=0,02$; Celsior® $p=0,019$; Salina $p=0,016$). Os valores de pressão arterial pulmonar foram semelhantes entre as três soluções nos dois tempos de isquemia, bem como na comparação entre os tempos de 6 e 12 horas, independente da solução. A Capacidade Relativa de Oxigenação não demonstrou diferença estatística entre as três soluções, independentemente do tempo de isquemia. Na comparação entre os dois tempos de isquemia, o desempenho da oxigenação foi significativamente pior nos pulmões preservados com salina por 12 horas ($p=0,001$). A razão peso úmido/peso seco não apresentou diferença estatística significativa entre as três soluções nos dois tempos de isquemia, porém na comparação entre os tempos de isquemia, os pulmões preservados com Perfadex® apresentaram uma relação peso úmido/peso seco maior no tempo de isquemia mais longo ($p=0,001$). À microscopia óptica, pulmões preservados com salina apresentaram mais edema que os demais, independentemente do tempo de isquemia. A avaliação da apoptose celular através do método de TUNEL não mostrou diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos. **CONCLUSÃO:** Os pulmões preservados com Perfadex® e Celsior® apresentaram desempenho similar em relação às trocas gasosas e parâmetros hemodinâmicos e de mecânica ventilatória. Os pulmões preservados com Perfadex® por 12 horas apresentaram mais edema. Os achados histopatológicos não diferiram entre os grupos estudados.

Descritores: Transplante pulmonar; Preservação de órgãos; Soluções para preservação de órgão; Modelos animais; Isquemia; Traumatismo por Reperfusão.

Summary

MENEZES AQ. Study of reperfused rat lungs in an ex vivo experimental model: comparison of two preservation solutions (Perfadex® and Celsior®) [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013, 85p.

INTRODUCTION: Ischemia-reperfusion injury remains the leading cause of mortality related to lung transplantation. Its severity is influenced by several factors including lung preservation. **OBJECTIVE:** To compare two lung preservation solutions, Perfadex® and Celsior® and its ability to preserve ischemic lung tissue. **METHODS:** Sixty rat lungs were preserved with Perfadex®, Celsior® or saline after a cold ischemic period of 6 or 12 hours and were then reperfused with homologous blood in an ex vivo experimental model for 60 consecutive minutes. At 10-minute intervals during reperfusion of the heart-lung blocks, data were collected for blood gases, hematocrit, mechanical ventilation, hemodynamic and the heart-lung block weight was recorded. At the end of reperfusion, the left lung was weighed and packaged kept at 70°C for 48h to obtain the wet-to-dry weight ratio. Lung tissue samples were processed for histology, electron microscopy and TUNEL. Statistical analysis included a comparison of the solutions and ischemic times, using ANOVA and Kruskal-Wallis. The significance level was set at 5%. **RESULTS:** The comparison between the compliance of lungs preserved with Celsior® and Perfadex® in ischemic times of 6 and 12 hours was not statistically significant ($p=0.161$ and $p=0.316$, respectively). The lungs subjected to 6 hours of ischemia showed higher lung compliance compared to 12 hours ($p=0.02$ Perfadex®; Celsior® $p=0.019$; saline $p=0.016$). The pulmonary artery pressure values were similar between the three solutions in two stages of ischemia and comparing the times of 6 and 12 hours, regardless of the solution. The Relative Oxygenation Capacity showed no significant difference between the three solutions tested, regardless of the ischemic time. The comparison between the two ischemic times showed that oxygenation capacity was significantly worse in lungs preserved with saline for 12 hours ($p=0.001$). The wet-to-dry weight ratio showed no statistically significant difference between the three solutions in both ischemic times. However, when ischemic times were compared, Perfadex® showed greater wet-to-dry weight ratio in lungs submitted to 12 hours of ischemia ($p=0.001$). Light microscopy showed that lungs preserved with saline had more edema than the others, regardless of the ischemic time. Assessment of apoptosis by the TUNEL assay showed no statistically significant difference in the comparison between the groups. **CONCLUSIONS:** The lungs preserved with Celsior® and Perfadex® performed evenly in regards to gas exchange, hemodynamics and ventilatory mechanics. The lungs preserved with Perfadex® for 12 hours were more edematous. Histopathology findings did not differ between the groups.

Descriptors: Lung Transplantation; Organ Preservation; Organ Preservation Solutions; Models, Animal; Ischemia; Reperfusion Injury.

1 Introdução

O transplante pulmonar é uma terapêutica estabelecida para doenças pulmonares terminais^{1,2}. A média anual de transplantes realizados no mundo já ultrapassou 3.500, em 2010³. Entretanto, a mortalidade e a morbidade relacionadas ao transplante pulmonar continuam sendo significativas, sendo que a lesão de isquemia-reperfusão permanece sendo a principal causa, ocorrendo entre 11% e 25% dos receptores e sendo responsável por 30% dos óbitos nos primeiros 30 dias após o transplante^{4,5}.

Trata-se de uma condição que ocorre tipicamente nas primeiras 72 horas após transplante e se caracteriza por lesão alveolar inespecífica, edema pulmonar e hipoxemia. Clinicamente, manifesta-se desde uma hipoxemia leve associada a esparsos infiltrados pulmonares, até um quadro dramático de síndrome de angústia respiratória aguda com necessidade de ventilação mecânica, terapia farmacológica e, em alguns casos, uso de oxigenação extracorpórea por membrana⁶. Quando ocorre com maior severidade clínica é chamada de Disfunção Primária do Enxerto, aumentando significativamente a morbidade e mortalidade dos pacientes submetidos ao transplante pulmonar.

A lesão de isquemia-reperfusão é uma forma de lesão pulmonar aguda decorrente da sequência de eventos iniciada com a morte cerebral do doador, seguida pela isquemia pulmonar, preservação pulmonar, pelo transplante propriamente dito e reperfusão do enxerto⁷. Além do seu papel no aumento da morbidade e mortalidade associada ao transplante de pulmão, ela também acarreta um risco aumentado de rejeição aguda, a qual pode levar à disfunção de enxerto a longo prazo⁴.

Além disso, há evidências de que em doadores cadavéricos há um aumento da concentração de interleucina IL-8, tanto no lavado broncoalveolar quanto no tecido pulmonar, havendo correlação com a incidência de lesão de isquemia-reperfusão⁸. Sabe-se que os doadores cadavéricos estão expostos a um somatório de processos inflamatórios relativos à morte cerebral, entubação prolongada, episódios de instabilidade hemodinâmica e infecções, sendo que todos podem aumentar a susceptibilidade do pulmão à lesão de isquemia-reperfusão.

O uso de isquemia hipotérmica, apesar de ser fundamental na preservação pulmonar, tendo em vista a diminuição da atividade metabólica e consequente redução na taxa de degradação de componentes celulares essenciais⁹, também está implicado na sucessão de eventos que propiciam a ativação de mediadores inflamatórios. Dentre estes eventos está a inativação da bomba Na/K-ATPase com consequente edema celular¹⁰; o acúmulo de oxidantes, principalmente devido à resposta do endotélio, macrófagos e neutrófilos marginados à isquemia, levando aos efeitos deletérios da peroxidação lipídica¹¹; à sobrecarga intracelular de cálcio, potencializando a ação dos radicais livres¹²; à liberação de ferro livre, promovendo as reações oxidativas e ativando a agregação plaquetária¹³; e, à indução de morte celular, tanto na forma de necrose como na forma de apoptose, ambas associadas à pior função pulmonar após a reperfusão¹⁴.

A lesão de isquemia-reperfusão está associada à morte celular em vários sistemas orgânicos. Fischer et al. mostraram a correlação entre o grau de apoptose e a lesão de isquemia-reperfusão, sendo que o papel das vias de morte celular programada e sua relevância no contexto do transplante pulmonar ainda são desconhecidos¹⁴. Quadri et al. realizaram estudo com inibidores de caspase em

modelo de transplante em ratos, demonstrando melhora da injúria de isquemia-reperfusão quando esta via da apoptose é bloqueada¹⁵.

A presença e gravidade da lesão de isquemia-reperfusão são influenciadas por vários fatores concernentes ao doador e às técnicas de preservação.

Ao longo da história do transplante pulmonar, várias estratégias foram empregadas buscando a prevenção e o tratamento da lesão de isquemia-reperfusão, reduzindo de forma importante sua incidência⁵. Dentre tais estratégias está a utilização e a otimização de soluções de preservação do órgão doado.

A função destas soluções é a de proporcionar uma melhor conservação da integridade do órgão após a sua retirada, bem como melhor função após períodos longos de isquemia, atuando, principalmente, através dos seguintes mecanismos: redução do edema intracelular e extracelular; prevenção da acidose intracelular; redução do estresse oxidativo; restauração do metabolismo intracelular; além de evitar o acúmulo intracelular de cálcio.

A metodologia utilizada para a validação destas soluções baseou-se no emprego de modelos de perfusão pulmonar ex-vivo, cujo objetivo foi o de permitir experimentações e medições nos tecidos vivos em um ambiente artificial e controlado.

Os primeiros modelos de perfusão pulmonar ex-vivo foram concebidos inicialmente com a utilização de pulmões de coelhos, perfundidos com sangue venoso homólogo obtido por exsanguinação de animais da mesma espécie. Nesses modelos foram realizados estudos para a determinação da temperatura ideal de preservação, além de testes de soluções de preservação pulmonar, os quais estabeleceram muitos dos princípios que, até hoje, norteiam as práticas de

preservação pulmonar em uso clínico^{16,17,18}. A desvantagem desses modelos residia na limitação da perfusão, em cerca de 10 min, uma vez que o sangue oxigenado pelo bloco pulmonar não mais retornava ao circuito. Houve, então, a modificação para sistemas similares em ratos, porém, esses modelos eram de difícil execução e controle por utilizarem um animal colocado em paralelo ao circuito de perfusão para efetuar a desoxigenação do sangue^{19,20,21}. Mais tarde, substituiu-se o animal desoxigenador por um oxigenador de membrana, simplificando sobremaneira o sistema, o qual tornou-se mais estável, permitindo perfusões prolongadas com a avaliação de parâmetros hemodinâmicos, de mecânica ventilatória e de trocas gasosas. O sistema de perfusão ex-vivo atual permite a aquisição de dados em tempo real com capacidade de armazenamento em computador, sendo comercializado com o nome de IL-2 - Isolated Perfused Rat or Guinea Pig Lung System (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA; Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, Alemanha). Sua ampla gama de utilização inclui: estudos de preservação pulmonar para transplante; estudos de mecânica ventilatória e de trocas gasosas em modelos de injúria pulmonar aguda; avaliação funcional em modelos de doença obstrutiva e vascular induzidas; efeitos pulmonares remotos em doenças metabólicas e endócrinas; metabolismo pulmonar de drogas; absorção e efeitos de drogas e agentes inaláveis; transporte de gases; alternativas de ventilação mecânica; entre outros^{22,23}.

Os principais tipos de solução de preservação utilizados ao longo da evolução do transplante pulmonar incluem as soluções intracelulares (alta concentração de potássio e baixa concentração de sódio), tais como Euro-Collins e Universidade de Wisconsin, e as soluções extracelulares (baixa concentração de

potássio e alta concentração de sódio), tais como LPD-Glicose (Perfadex®) e Celsior®.

Historicamente, a solução Euro-Collins foi desenvolvida para a preservação de rim, a da Universidade de Wisconsin para preservação de fígado e a Celsior® para preservação do coração. Perfadex® foi a única solução desenvolvida especificamente para preservação pulmonar, até o momento⁵.

As soluções intracelulares foram as primeiras a serem desenvolvidas, tendo sido utilizadas por cerca de duas décadas nos transplantes de órgãos, inclusive para o pulmão. A utilização de soluções de preservação extracelulares foi proposta inicialmente por Fujimura et al.²⁴ no Japão, em meados da década de 1980, a partir de estudos que demonstraram sua eficácia na preservação de pâncreas por até 72 horas. Estes autores demonstraram que esta solução extracelular modificada era superior à Euro-Collins em promover uma preservação de enxertos pulmonares. Outros grupos realizaram estudos comparando os dois tipos de solução, chegando a conclusões semelhantes. Mais tarde, outras soluções extracelulares foram criadas para a preservação de órgãos sólidos (como exemplo, UW, Low-potassium UW etc) com seu uso adaptado à preservação pulmonar²⁵.

Atualmente, na grande maioria dos serviços de transplante pulmonar no mundo, as únicas soluções utilizadas para preservação pulmonar na prática clínica são as soluções do tipo extracelulares, Perfadex® e Celsior®. A Tabela 1 mostra a composição destas duas soluções.

Tabela 1. Composição do Celsior® e Perfadex®

	Celsior®	Perfadex®
Na ⁺ , mmol/l	100	138
K ⁺ , mmol/l	15	6
Mg ²⁺ , mmol/l	13	0,8
Ca ²⁺ , mmol/l	0,26	-
Cl ⁻ , mmol/l	41,5	142
SO ₄ ²⁻ , mmol/l	-	0,8
PO ₄ ²⁻ , mmol/l	-	0,8
Histidina, mmol/l	30	-
Dextran 40, %	-	5
Manitol, mmol/l	60	-
Glicose, %	-	0,91
Glutamato, mmol/l	20	-
Lactobionato, mmol/l	80	-
Glutathiona, mmol/l	3	-

A solução Perfadex® tem como principais vantagens seu baixo teor de potássio, o que parece ser menos lesivo à integridade estrutural e funcional das células endoteliais, podendo levar à diminuição na produção de oxidantes e vasoconstritores, e à presença de Dextran 40®, uma macromolécula capaz de aumentar a pressão oncótica e melhorar a capacidade de deformação das hemácias, também prevenindo a agregação e induzindo a uma desagregação eritrocitária, além de apresentar efeito antitrombótico por ação na superfície endotelial e plaquetária. Esses efeitos contribuem para melhorar a microcirculação pulmonar e preservam a interface endotélio-epitélio, o que pode secundariamente reduzir o grau de extravasamento de água e proteínas no momento da reperfusão²⁶.

A solução Celsior® possui em sua composição várias substâncias que possuem ação antioxidante, tais como histidina, manitol, lactobionato e glutathiona²⁷. Em meados da década de 1990, foram publicados estudos sobre o uso de Celsior® na

preservação pulmonar, com relatos de bons resultados em comparação tanto com soluções intracelulares, quanto com o Perfadex®, notadamente com a utilização de tempo de isquemia curto²⁸. Vários centros de transplante pulmonar, sobretudo europeus, utilizam Celsior® na preservação pulmonar, a despeito de ter sido uma solução criada visando o metabolismo cardíaco.

Apesar dos estudos já realizados, permanece controversa a superioridade de uma solução sobre a outra quanto à capacidade de proporcionar a mais satisfatória preservação pulmonar.

Buscamos, neste estudo, comparar as duas soluções, utilizando um modelo de perfusão ex-vivo com o objetivo de esclarecer dúvidas e controvérsias quanto ao desempenho de ambas na preservação pulmonar pós-isquemia.

Acrescentamos como justificativa deste estudo o fato de os dois principais trabalhos realizados em um modelo experimental semelhante^{28,29} terem utilizado tempos de isquemia muito curtos, duas e quatro horas. Além disso, pesa também o fato de que o Serviço de Transplante Pulmonar do INCOR-HC-FMUSP utiliza o Perfadex® como solução de preservação em vista da experiência de outros serviços de transplantes na América do Norte. Entretanto, uma vez que entraves burocráticos, atrasos de importação e eventuais ausências desta solução no mercado nacional podem eventualmente causar a suspensão da realização de transplantes por esse Serviço, faz-se necessário avaliar o uso da solução Celsior® como uma opção à falta da solução Perfadex®.

2 Objetivos

2.1 Geral

Comparar duas soluções de preservação pulmonar, Perfadex® e Celsior®, quanto à capacidade de preservação de tecido pulmonar isquêmico, utilizando um modelo experimental para perfusão de pulmões isolados de ratos.

2.2 Específicos

- Avaliar o desempenho pós-reperfusão dos pulmões preservados com Celsior® ou Perfadex® no que se refere às trocas gasosas, hemodinâmica, mecânica ventilatória e edema;
- Comparar os achados histopatológicos pós-reperfusão dos pulmões preservados com Celsior® ou Perfadex®.

3 Revisão da Literatura

3.1 Preservação pulmonar

A isquemia é caracterizada pela ausência de fluxo sanguíneo fisiológico no órgão, o que é inevitável a partir do momento em que este é retirado do corpo. Essa ausência de fluxo leva a alterações celulares que podem resultar em disfunção temporária ou permanente após o implante. O papel da preservação pulmonar é o de minimizar os efeitos da isquemia, mantendo a integridade funcional e morfológica do pulmão, resultando em uma melhor função pulmonar após o implante.

A busca por métodos capazes de amenizar os efeitos deletérios da isquemia sempre foi uma constante na história do transplante de órgãos e, mais ainda, na história do transplante de pulmão, em vista da alta susceptibilidade deste aos danos isquêmicos. Apresentaremos abaixo os principais métodos utilizados para a preservação pulmonar relatados na literatura:

3.1.1 Hipotermia

Estudos realizados em cães, desde a década de 1950, revelaram que o grau de lesão pulmonar era proporcional ao tempo de isquemia, demonstrando que os pulmões toleravam mal períodos superiores a 90 minutos de isquemia normotérmica e que pulmões submetidos a mais de uma hora de isquemia “quente” evoluíam com disfunção severa¹¹. A hipotermia reduz a atividade metabólica de tal modo que a

viabilidade celular pode ser mantida em face da isquemia (5% da taxa metabólica a 37°C)³⁰. Em vista destes achados, a hipotermia tornou-se a base da maioria dos métodos de preservação pulmonar.

Um dos métodos utilizados foi o uso do **resfriamento tópico**, ou seja, a imersão do pulmão em solução hipotérmica. Essa tática resultou de estudos experimentais da década de 1960, que demonstraram que o resfriamento dos pulmões isquêmicos resultava em melhor função pulmonar após o transplante³¹. Esse foi o método de preservação utilizado pelo grupo de Toronto nos seus primeiros casos de transplante de pulmão, o que possibilitou tempos de isquemia de até 5 horas³².

O **resfriamento do doador em circulação extracorpórea (CEC)** foi um método de preservação usado por alguns grupos. Consistia em colocar o doador em CEC (uma cânula na aorta ascendente e outra cânula no átrio direito) e resfriá-lo até 10°C. O problema do método era a sua complexidade, que incluía a necessidade de um dispositivo de CEC e um perfusionista treinado. Além disso, o resfriamento dos pulmões era lento, já que durante a CEC, o fluxo sanguíneo dos pulmões só ocorria através das artérias brônquicas³³.

3.1.2 Perfusão anterógrada da artéria pulmonar

A perfusão anterógrada da artéria pulmonar (single flush perfusion) consiste na infusão de aproximadamente 60 ml/kg de uma solução de preservação a 4°C através de uma cânula introduzida no tronco da artéria pulmonar. Esta técnica foi descrita pela primeira vez por White et al. em 1966³⁴.

Collins et al.³⁵ e Sacks et al.³⁶ demonstraram que o método de preservação baseado na perfusão do órgão era capaz de proteger os rins da injúria de isquemia por até 72 horas. A possibilidade de que esse método funcionasse para preservação pulmonar foi confirmada em trabalhos posteriores³⁷. Apoiados por essas evidências, e por seus próprios trabalhos experimentais em primatas, o grupo de Stanford usou a perfusão da artéria pulmonar com a solução Euro-Collins no seu programa pioneiro de transplante coração-pulmão, no início da década de 1980, obtendo excelentes resultados³⁸.

A vantagem da técnica é a sua simplicidade e também a facilidade de execução, permitindo um resfriamento rápido, eficiente e uniforme dos pulmões³³. Locke et al. compararam a técnica de resfriamento tópico com a perfusão da artéria pulmonar com Euro-Collins em um modelo de alotransplante pulmonar unilateral em cães, após 6 horas de isquemia. Eles concluíram que a perfusão com Euro-Collins produzia um resfriamento mais rápido e eficiente, resultando em excelente desempenho pulmonar³⁹. A perfusão anterógrada da artéria pulmonar é o método mais usado atualmente em todo o mundo, nos transplantes clínicos.

3.1.3 Perfusão retrógrada da artéria pulmonar

A perfusão pulmonar retrógrada consiste na administração da solução de preservação através do apêndice atrial esquerdo ou das veias pulmonares, usualmente 250 ml para cada uma, com drenagem do efluente através da artéria pulmonar. As primeiras descrições desta técnica foram feitas por Sarsam et al.⁴⁰ (1993) e Varela et

al.⁴¹ (1996). Esta via de perfusão tem a vantagem de perfundir tanto a circulação pulmonar quanto a circulação brônquica, o que potencialmente proporciona uma limpeza mais efetiva das células sanguíneas presentes nos capilares e uma melhor distribuição da solução ao longo da árvore traqueobrônquica. Adicionalmente, tem ainda a vantagem de remover coágulos e êmbolos presentes nas artérias pulmonares.

Experimentalmente, alguns autores compararam o uso da via retrógrada com a anterógrada e evidenciaram que a perfusão retrógrada proporcionou uma melhor preservação pulmonar⁴²⁻⁴⁶. Entretanto, a combinação de ambas as técnicas parece oferecer uma função pulmonar mais satisfatória, e muitos centros de transplante combinam uma perfusão anterógrada seguida de uma perfusão retrógrada⁴⁷.

3.1.4 Temperatura da solução de preservação

Wang et al.⁴⁸ (1989), em um estudo com coelhos em um modelo de perfusão pulmonar ex-vivo, no qual os pulmões foram perfundidos com sangue, concluíram que a preservação pulmonar a 10° C é superior a preservação a 15 ou 4° C. Em uma publicação de 1993⁴⁹, esses mesmos autores, empregando o mesmo modelo experimental, porém utilizando a solução LPD, concluíram que a perfusão pulmonar com solução de preservação a 23°C resultou em função pós-isquêmica superior à perfusão com solução a uma temperatura de 10°C.

Shiraishi et al.⁵⁰ (1994), estudando os efeitos da temperatura em pulmões de ratos, perfundidos com solução salina em um modelo de perfusão pulmonar ex-vivo,

concluíram que os pulmões perfundidos com solução a temperatura de 12°C apresentaram valores de pressão de artéria pulmonar inferiores aos pulmões perfundidos a 10°C.

A despeito destas evidências em modelos experimentais, e enquanto a temperatura ideal para a solução de preservação pulmonar continua sendo discutida, a maioria dos centros usam uma temperatura de perfusão de 4° a 8°C⁵¹. O que sabemos ao certo é que a preservação a temperaturas frias continua a ser um importante componente da preservação pulmonar³⁰.

3.1.5 Volume da solução de preservação

O volume de solução de preservação requerido para a limpeza adequada das células sanguíneas da vasculatura pulmonar, e para otimizar a função do enxerto, é dependente do tamanho do órgão e da taxa de fluxo de perfusão⁵¹. Haverich et al.⁵² (1986) constataram que um volume de solução de 60 ml/Kg administrado a uma alta taxa de fluxo melhorou o resfriamento pulmonar e a função pós-operatória do enxerto. Embora Steen et al.⁵³ (1993) tenham recomendado volumes em torno de 150 ml/Kg, não foram observadas vantagens tão significantes em comparação ao uso de 60 ml/Kg de volume.

Usualmente, na prática clínica, em torno de 60 ml/Kg de solução de preservação são infundidos, em um tempo de 15 a 20 minutos, após a extração pulmonar, limpando satisfatoriamente os pulmões de células sanguíneas e refrigerando uniformemente o órgão^{51,54}.

3.1.6 Pressão de infusão da solução de preservação

Os dados científicos referentes à pressão de artéria pulmonar ideal para infusão da solução de preservação são limitados. A pressão necessária para completa lavagem do leito vascular deve ser balanceada com as possibilidades de danos à vasculatura pulmonar de baixa pressão⁵¹. Sasaki et al.⁵⁵ (1996) avaliaram, em um modelo de perfusão pulmonar ex-vivo em coelhos, a pressão de artéria pulmonar para infusão da solução de preservação (200 ml de solução tipo extracelular) e observaram que uma pressão de 10 a 15 mmHg proporcionou função pulmonar significativamente melhor do que infusões a pressões de 20 e 25 mmHg. Tanaka et al.⁵⁶ (1998), utilizando um modelo experimental semelhante e estudando a função do óxido nítrico no pulmão preservado, concluíram que a pressão de infusão deve ser inferior a 20 mmHg. Tipicamente, a pressão atualmente empregada é de 10 a 15 mmHg, não devendo exceder uma pressão máxima de 22 mmHg.

3.1.7 Insuflação e ventilação pulmonar durante preservação

O estado de insuflação pulmonar durante a perfusão arterial e armazenamento provavelmente tem um significativo impacto na função do pulmão pós-transplante⁵⁷. Três mecanismos primários parecem contribuir para o efeito protetor da insuflação: a manutenção de um metabolismo aeróbico eficiente; a preservação da integridade do surfactante pulmonar; e a melhora do transporte do fluido epitelial.

Puskas et al.⁵⁸ (1992) demonstraram que pulmões caninos perfundidos com solução Euro-Collins modificada e armazenados em um estado de hiperinsuflação proporcionaram uma função pulmonar pós-transplante mais satisfatória após 30 horas de isquemia, quando comparados com pulmões armazenados com baixos volumes pulmonares. Entretanto, Haniuda et al.⁵⁹ (1996) observaram, em pulmões de coelhos perfundidos com 200 ml de solução LPD, que a hiperinsuflação produz o aumento da permeabilidade capilar pulmonar. DeCampos et al.⁶⁰ (1998) concluíram, utilizando um modelo de perfusão pulmonar em ratos, que a insuflação pulmonar ideal é de 50% da capacidade pulmonar total para evitar hiperdistensão. Esse é o parâmetro usualmente empregado na prática clínica atual, associado a uma insuflação limitada a uma pressão de via aérea de 20 cmH₂O e uma fração inspirada de oxigênio (FiO₂) na faixa de 30 a 50%.

3.1.8 Infusão de prostaglandinas

Puskas et al.⁶¹ (1992) observaram que a infusão de prostaglandina E1 como pré-tratamento do pulmão doado evidenciou uma atividade vasodilatadora que compensava a vasoconstrição induzida pela isquemia fria e proporcionava uma perfusão mais efetiva do órgão.

Estudos posteriores, como os de Perrot et al.⁶² (2001) e Gohrbandt et al.⁶³ (2005), encontraram propriedades adicionais das prostaglandinas, particularmente a de regulação das citocinas pró-inflamatórias, que é provavelmente a mais importante no combate à injúria de isquemia-reperfusão.

Atualmente, muitos centros rotineiramente injetam soluções de prostaglandinas na artéria pulmonar para auxiliar na perfusão do órgão e na prevenção dos danos pós-reperfusão.

3.1.9 Soluções de preservação pulmonar

Além da hipotermia, que proporcionava a diminuição do metabolismo celular, fazia-se necessário o fornecimento de substratos metabólicos para o órgão isquemiado. Foram então criadas as soluções de preservação.

As primeiras soluções de preservação pulmonar utilizadas eram do tipo intracelular, sendo a Euro-Collins a principal solução empregada nos primeiros transplantes de pulmão.

Estudos experimentais e clínicos têm favorecido o uso de soluções extracelulares, baixa concentração de potássio e alta concentração de sódio, sobre o de intracelulares na preservação pulmonar. Como exemplos de soluções extracelulares temos: LPD-Glicose (Perfadex®), solução de Cambridge, Celsior® e Papworth.

Com base nestes estudos, as soluções extracelulares são, atualmente, as mais utilizadas na prática clínica dos transplantes pulmonares, sendo que, como já mencionamos acima, as soluções Perfadex® e Celsior® são as mais utilizadas em todo o mundo.

3.1.9.1 LPD-Glicose (Perfadex®)

Em 1989, Keshavjee et al.⁶⁴ demonstraram que a associação de baixas concentrações de potássio e Dextran 40® promoviam melhor função pulmonar após isquemia de 12 horas quando comparada a Euro-Collins em um modelo canino. Após esses experimentos, Date et al.⁶⁵ observaram, em 1993, que a adição de glicose a 1% provia um substrato para o metabolismo aeróbico possibilitado pela insuflação pulmonar, acarretando um aumento do tempo de isquemia em cães para 24 horas.

Em 1993, Steen et al.⁶⁶ buscaram avaliar a solução Perfadex®, utilizando pulmões de porcos preservados nesta solução por um tempo de isquemia fria de 24 horas seguida de transplante pulmonar único combinado com imediata pneumonectomia contralateral. Concluíram que a solução Perfadex® demonstrou excelente função pulmonar após um período de reperfusão de 24 horas. Desta forma, ampliaram os resultados obtidos em publicação anterior (1993), em que o tempo de isquemia utilizado foi de 12 horas⁵³.

Uma das primeiras publicações a apresentar resultados do uso do LPD-Glicose na prática clínica foi feita por Müller et al.⁶⁷, do Munich Lung Transplant Group, em 1999, no qual os autores analisaram 80 pacientes submetidos a transplante pulmonar, sendo 48 perfundidos com Euro-Collins e 32 com LPD-Glicose. Eles observaram que, apesar de um tempo operatório significativamente mais longo e um maior tempo de isquemia, uma melhora global da função inicial do enxerto foi obtida no grupo LPD-Glicose. Eles concluíram, portanto, que os efeitos benéficos do LPD-Glicose, como observado em estudos experimentais prévios, podiam também ser obtidos no transplante pulmonar clínico.

Fischer et al.⁵⁴, do Toronto Lung Transplant Program, em 2001, animados com a experiência inicial com o uso do LPD-Glicose iniciado por eles em 1998, compararam o uso desta solução com a Euro-Collins em 94 procedimentos de transplante pulmonar em humanos, utilizando como *end point* primário a função inicial do enxerto na chegada do paciente à unidade de tratamento intensivo, sendo essa função avaliada pela razão entre a pressão arterial de oxigênio e a fração inspirada de oxigênio (PaO₂/FIO₂). E, como *end point* secundário, eles utilizaram o escore de APACHE na chegada do paciente à unidade de tratamento intensivo e 30 dias após o paciente ter sido submetido ao transplante coração-pulmão ou pulmonar bilateral. Eles observaram que os enxertos preservados com LPD-Glicose demonstraram melhor função pulmonar na fase inicial pós-transplante do que os preservados com Euro-Collins, apesar do maior tempo de isquemia dos pulmões preservados com LPD-Glicose.

Strüber et al.⁶⁸, da Hannover Medical School, Alemanha, também no ano de 2001, publicaram sua experiência inicial com o uso do LPD-Glicose na prática clínica, comparando 51 pacientes transplantados com preservação pulmonar por LPD-Glicose a um grupo-controle histórico de 55 pacientes que haviam sido transplantados com o uso da solução então em uso, a Euro-Collins. Eles observaram que houve uma diminuição da mortalidade peri-operatória e da morbidade dos pacientes transplantados com a substituição do protocolo de preservação pulmonar com Euro-Collins para LPD-Glicose.

Torres et al.⁶⁹ (2009), com o objetivo de avaliar o efeito potencial de LPD no estresse oxidativo quando administrado na circulação periférica, utilizando um modelo com ratos, concluíram que a injúria de isquemia-reperfusão, quando mediada

por espécies ativas de oxigênio, pode ser atenuada pelo uso do LPD administrado sistemicamente. Da mesma forma, em outra publicação (2008), utilizando o mesmo modelo, os autores observaram um declínio na peroxidação lipídica imediatamente após a reperfusão, sugerindo uma resposta adaptativa ou um efeito protetor do LPD contra este efeito⁷⁰.

A introdução da solução LPD-Glicose após sua descrição original há duas décadas foi gradual, a despeito de seus resultados experimentalmente terem sido superiores à maioria das outras soluções^{26,71}.

3.1.9.2 Celsior®

Celsior® é uma solução do tipo extracelular desenvolvida para uso em transplante cardíaco. Uma das primeiras publicações sobre o seu uso na preservação cardíaca foi feita por Menasché et al.⁷² em 1994. Nesta mesma década surgiram vários trabalhos demonstrando a eficácia desta solução também na preservação de tecido pulmonar.

Em 1995, Reignier et al.⁷³, utilizando um modelo de perfusão pulmonar isolada em ratos, mostraram uma redução significativa na lesão de isquemia-reperfusão induzida por aumento da permeabilidade da microvasculatura pulmonar com o uso da solução Celsior® quando comparada à solução Wallwork. No entanto, este estudo careceu de qualquer avaliação de troca gasosa como o mais importante indicador de função do enxerto pós-isquemia.

Barr et al.⁷⁴ (1997) e Wittwer et al.⁷⁵ (1999), também utilizando um modelo

de perfusão pulmonar isolada em ratos, encontraram resultados semelhantes avaliando a troca gasosa sanguínea com um significativo aumento na capacidade de oxigenação de pulmões preservados com Celsior® quando comparados com a solução Euro-Collins.

Xiong et al.²⁷ (1999) utilizaram um modelo in vivo de transplante pulmonar alógeno em ratos, e constataram a eficácia da solução Celsior® como solução de preservação de enxertos pulmonares, inclusive sugerindo, em vista do uso estabelecido desta solução na preservação cardíaca, Celsior® como solução unificada para preservação de órgãos torácicos.

Fehrenbach et al.⁷⁶ (1999) publicaram um estudo, também utilizando um modelo de perfusão pulmonar isolada em ratos, no qual concluíram que a preservação com a solução Celsior® em comparação com Euro-Collins e com Celsior® associado a prostaciclina, resultou em melhores parâmetros de preservação pulmonar. Defendem, portanto, que a solução Celsior® tem promissoras vantagens na preservação clínica de pulmões.

Roberts et al.⁷⁷ (1999) concluíram que a solução Celsior® proporcionou melhor preservação pulmonar do que a Euro-Collins ou a da Universidade de Wisconsin, demonstrada por aumento da oxigenação, declínio da permeabilidade capilar e melhora da complacência, avaliando pulmões de ratos submetidos a 6 ou 12 horas de isquemia e reperfundidos por 90 minutos em um modelo ex-vivo. Esses resultados foram considerados relevantes, uma vez que Euro-Collins e Universidade de Wisconsin eram as mais comuns soluções de preservação pulmonar utilizadas clinicamente na época.

D'armini et al.⁷⁸ (2001) realizaram um importante estudo clínico

randomizado e prospectivo, comparando Celsior® com a solução da Universidade de Wisconsin e constataram a validade do Celsior® como solução de preservação pulmonar em transplantes clínicos com tempos de isquemia superiores a 8 horas.

Atualmente, muitos centros de transplante pulmonar, principalmente na Europa, utilizam a solução Celsior® rotineiramente em seus transplantes clínicos.

3.1.9.3 Estudos comparando Perfadex® e Celsior®

Wittwer et al.²⁸ (1999) em um estudo avaliando comparativamente as soluções Perfadex® e Celsior® em relação ao impacto do tempo de isquemia na função pulmonar pós-isquêmica precoce, em um modelo de perfusão pulmonar extracorpórea em ratos, concluíram que ambas as soluções promoveram suficiente preservação da função pulmonar após períodos curtos de isquemia (duas horas). Entretanto, após um tempo de isquemia maior (quatro horas), a solução Perfadex® demonstrou significativa deterioração da função do enxerto quando comparada com a solução Celsior®, a qual evidenciou resultados superiores em termos de capacidade de oxigenação.

Um estudo realizado por esses mesmos autores e publicado em 2000²⁹, utilizando um mesmo modelo de perfusão extracorpórea em ratos, concluiu que a solução Celsior® proporcionou melhor preservação pulmonar do que a solução Perfadex® quando administrada anterogradamente. A aplicação retrógrada da solução Perfadex® resultou em significativa melhora funcional quando comparada

com a sua aplicação pela via anterógrada, atingindo o padrão de proteção oferecido pela solução Celsior® neste estudo.

Diferentemente das duas publicações mencionadas acima, nosso estudo utiliza um modelo de perfusão pulmonar ex-vivo mais moderno, submete os pulmões a um tempo de isquemia bem maior (6 e 12 horas) e analisa mais parâmetros do que os analisados pelos referidos trabalhos.

Sommer et al.⁷⁹ (2004), em seu estudo comparando as soluções LPD e Celsior® em pulmões de porcos transplantados após 24 horas de isquemia fria, concluíram que a solução Celsior® promoveu visível melhora da função do enxerto pós-isquemia, quando comparada à solução LPD. Edema pulmonar e elevação da resistência vascular pulmonar mostraram-se mais pronunciados no grupo LPD quando comparados ao grupo Celsior®. Parâmetros cruciais de função pulmonar, como oxigenação arterial, função endotelial e atividade surfactante, permaneceram preservados com a solução Celsior® e mostraram uma tendência a serem melhorados quando comparados aos pulmões preservados com LPD.

Wittwer et al.⁸⁰ (2005), utilizando pulmões de porcos e comparando as duas soluções após um período de isquemia fria de 27 horas, concluíram que pulmões preservados com a solução Celsior® apresentaram resultados desastrosos, com 100% de mortalidade devido à injúria de isquemia-reperfusão letal com falência de câmara cardíaca direita e extenso edema intrapulmonar. Em contraste, a solução Perfadex® proporcionou suficiente preservação pulmonar mesmo após este período extenso de isquemia. Neste estudo, eles compararam também as vias de administração anterógrada e retrógrada, e concluíram que a administração retrógrada da solução Celsior® não melhorou a qualidade de preservação atingida com esta solução,

considerando-a imprópria para a preservação de pulmões submetidos a períodos prolongados de isquemia. Já a solução Perfadex® administrada por via retrógrada resultou em significativa melhora funcional e histológica quando comparada com a perfusão anterógrada.

Mühlfeld et al.⁸¹ (2007), em um estudo em porcos, com tempo de isquemia de 27 horas e reperfusão por 6 horas, comparando a influência do Perfadex® e Celsior® nas alterações morfológicas induzidas pelo mecanismo de isquemia-reperfusão, evidenciaram que a solução Perfadex® efetivamente previne a formação de edema intra-alveolar, septal e peribroncovascular, bem como os danos à barreira alvéolo-capilar durante o episódio de isquemia-reperfusão. Concluíram, ainda, que a solução Celsior® não foi efetiva em preservar o pulmão das injúrias morfológicas deste mecanismo.

Em um estudo comparando as soluções Perfadex® e Celsior® em relação à capacidade de proteção vascular pulmonar na microcirculação, através de avaliação eletrofisiológica celular e mecânica, utilizando vasos de pulmões de porcos, WU et al.⁸² (2009) evidenciaram que, em relação ao relaxamento da musculatura lisa pulmonar endotélio-dependente e hiperpolarização, a solução Perfadex® é superior à Celsior® tanto no nível celular quanto no vascular.

Pizanis et al.⁸³ (2011), em um estudo avaliando a injúria produzida pela isquemia fria em células epiteliais pulmonares humanas e o papel de prevenção desta injúria pela adição de quelantes de ferro às soluções de preservação, observaram que a solução Perfadex® comparada à solução Celsior®, entre outras, foi a única que demonstrou superioridade marginal em proporcionar uma proteção adequada, possivelmente devido ao seu componente Dextran®. Entretanto, na presença de

quelantes de ferro, a solução Perfadex® pareceu ser inferior às outras soluções na prevenção da injúria produzida pela isquemia fria.

Podemos observar, por esses estudos, que ainda persistem controvérsias em relação à superioridade de uma solução sobre a outra, Perfadex® e Celsior®, quanto ao desempenho mais satisfatório na preservação do tecido pulmonar isquêmico.

4.1 Animais e grupos

Os animais receberam os cuidados de acordo com os *Principles of Laboratory Animal Care* formulados pelo National Society for Medical Research e o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, preparado pelo Institute of Laboratory Animal Resources e publicado pelo National Research Council of the National Academy Press 1996, p. 1-35.

Ratos machos da raça Wistar-Furth, pesando entre 200 e 450g, foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram operados no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica (LIM61). Os grupos foram divididos conforme os tempos de isquemia, em 6 horas e 12 horas, e quanto ao tipo de solução de perfusão utilizada: Perfadex® (Vitrolife, Kungsbacka, Suécia), Celsior® (Genzyme, França) e solução fisiológica a 0,9% (Baxter, Brasil). A solução fisiológica 0,9% foi utilizada neste estudo como grupo controle. A Figura 1 mostra a distribuição dos animais em grupos.

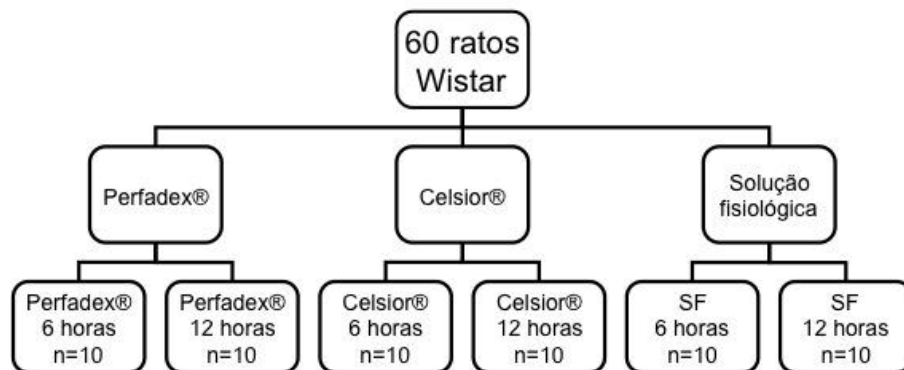


Figura 1. Distribuição dos animais em grupos de acordo com o perfusato utilizado para a preservação e o tempo de isquemia

4.2 Extração do bloco cardiopulmonar e isquemia fria

Após anestesiados com tiopental sódico (50mg/kg por via intraperitoneal), os animais foram pesados e colocados na prancha de preparação, então procedeu-se à exposição cirúrgica da traqueia cervical, traqueostomia e início da ventilação mecânica (ar ambiente; VC=10ml/kg peso; FR=70 ciclos/min; e PEEP=1 cmH₂O) com uso de ventilador mecânico de roedores (Harvard Apparatus IL-2[®]). Em seguida foi realizada uma laparotomia com exposição da veia cava inferior, pela qual foram administradas 1.500 UI de heparina para anticoagulação. O diafragma foi aberto radialmente e a caixa torácica foi exposta através de uma esternotomia, seguida de timectomia. A veia cava supradiafragmática foi exposta após secção do ligamento pulmonar inferior. O ventrículo direito foi seccionado de modo adjacente à artéria

pulmonar. Em seguida foram seccionados a veia cava inferior e o ventrículo esquerdo. A artéria pulmonar foi canulada através da ventriculotomia direita e os pulmões perfundidos por via anterógrada com 20 ml de solução hipotérmica a 4°C, administrada por gravidade a partir de um reservatório posicionado 10 cm acima do coração, com drenagem do efluente pela ventriculotomia esquerda. As soluções foram perfundidas, de acordo com a randomização por sorteio (Perfadex®, Celsior® ou solução fisiológica a 0,9%) (Figura 2).

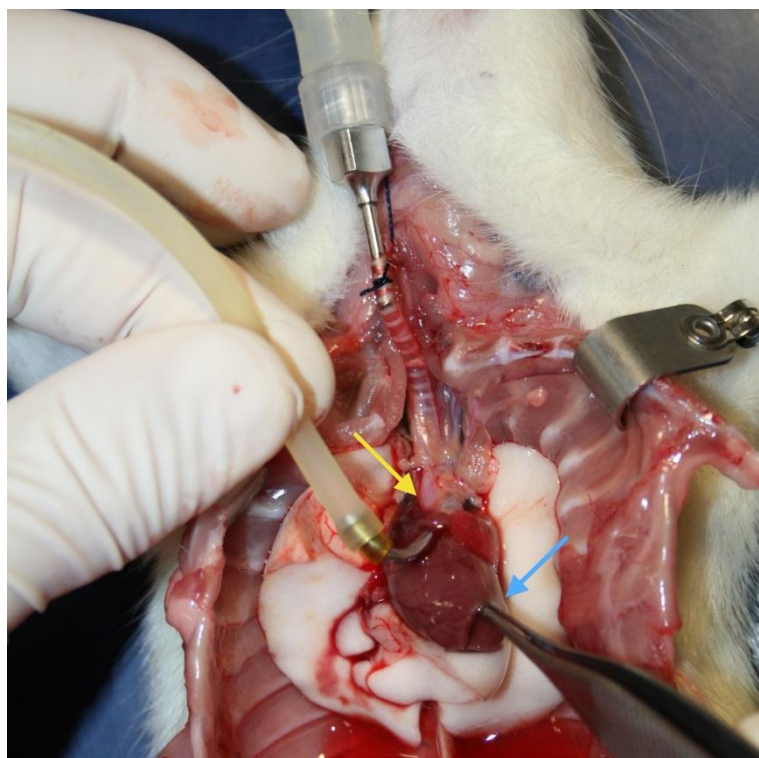


Figura 2. Canulação da artéria pulmonar através de ventriculotomia direita (seta amarela) e perfusão pulmonar anterógrada com drenagem do efluente pela ventriculotomia esquerda (seta azul)

Ao término da perfusão, a traqueia foi ocluída por ligadura abaixo da cânula e seccionada com os pulmões insuflados. Procedeu-se, então, à extração do bloco cardiopulmonar em sentido craniocaudal a partir do estreito cérvicomedial por tração anterior e inferior da traqueia com dissecação desta do mediastino posterior (Figura 3). O bloco foi removido e acondicionado em recipiente contendo a mesma solução utilizada para perfusão e armazenado a 4°C por 6 ou 12 horas, conforme randomização por sorteio .

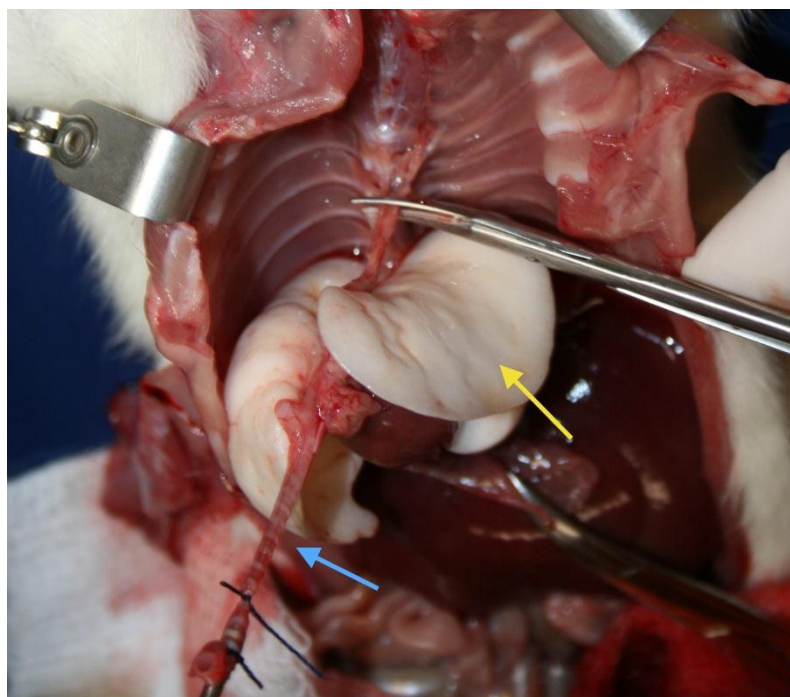


Figura 3. Extração do bloco cardiopulmonar em sentido craniocaudal. A traqueia (seta azul) foi ocluída por ligadura abaixo da cânula para manter os pulmões insuflados (seta amarela)

4.3 Reperusão

Trinta a quarenta minutos antes da reperusão, três animais foram anestesiados, submetidos a laparotomia para exposição da veia cava inferior, a qual foi puncionada para heparinização (1.500 UI) e coleta de sangue. O sangue retirado foi diluído em soro fisiológico a 0,9% para obter-se 80 ml de solução sanguínea com hematócrito entre 15 e 20%, sendo então colocada em reservatório aquecido e circulado no aparelho de perfusão ex-vivo IL-2 *Isolated Perfused Rat or Guinea Pig Lung System* (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA; Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, Alemanha) para preenchimento do sistema (Figura 4).

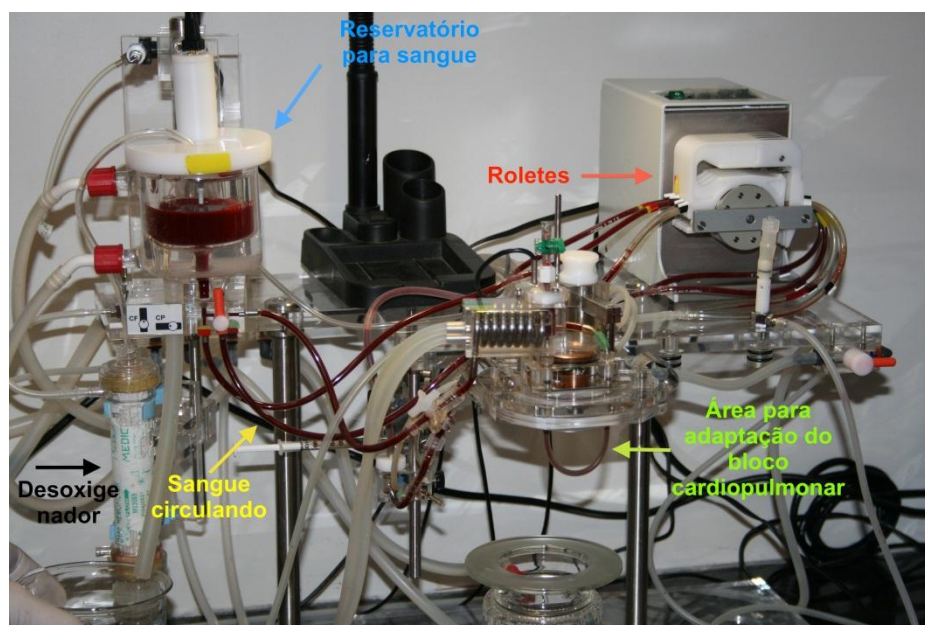


Figura 4. Sangue coletado e aquecido, circulando no aparelho de perfusão ex-vivo IL-2 (*Isolated Perfused Rat or Guinea Pig Lung System*) para preenchimento do sistema

O bloco cardiopulmonar foi preparado para ser adaptado ao aparelho, iniciando-se com a recanulação da traqueia com o adaptador para o sistema de ventilação e a instalação de cânula no átrio esquerdo através da ventriculotomia esquerda, realizada durante a extração do bloco, e mantida no local por sutura em “U” com fio de nylon 4.0. Um fio inabsorvível foi posicionado no seio transversal e um nó não ajustado foi mantido. Em seguida o bloco cardiopulmonar foi conectado ao aparelho de perfusão ex-vivo IL-2 *Isolated Perfused Rat or Guinea Pig Lung System* (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA; Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, Alemanha) através de: fixação da cânula traqueal à extremidade do ventilador; canulação da artéria pulmonar pela ventriculotomia direita, realizada durante a extração do bloco, e fixação desta pelo ajuste do nó previamente posicionado no seio transversal; início da perfusão com preenchimento da cânula da artéria pulmonar, bloco cardiopulmonar e cânula do átrio esquerdo com sangue desoxigenado durante passagem pelo desoxigenador de membrana (Medisulfone® D150 Hemofilter, Medica, Medolla, Itália) com 0,245 m² de área de contato e recebendo continuamente uma mistura gasosa com 90% de N₂ e 10% de CO₂ a um fluxo de 200 a 300 ml/min; e, por último, conexão da cânula do átrio esquerdo ao aparelho de perfusão ex-vivo IL-2 após observada a eliminação do ar presente no sistema. A Figura 5 ilustra o aspecto final do bloco cardiopulmonar adaptado ao aparelho.

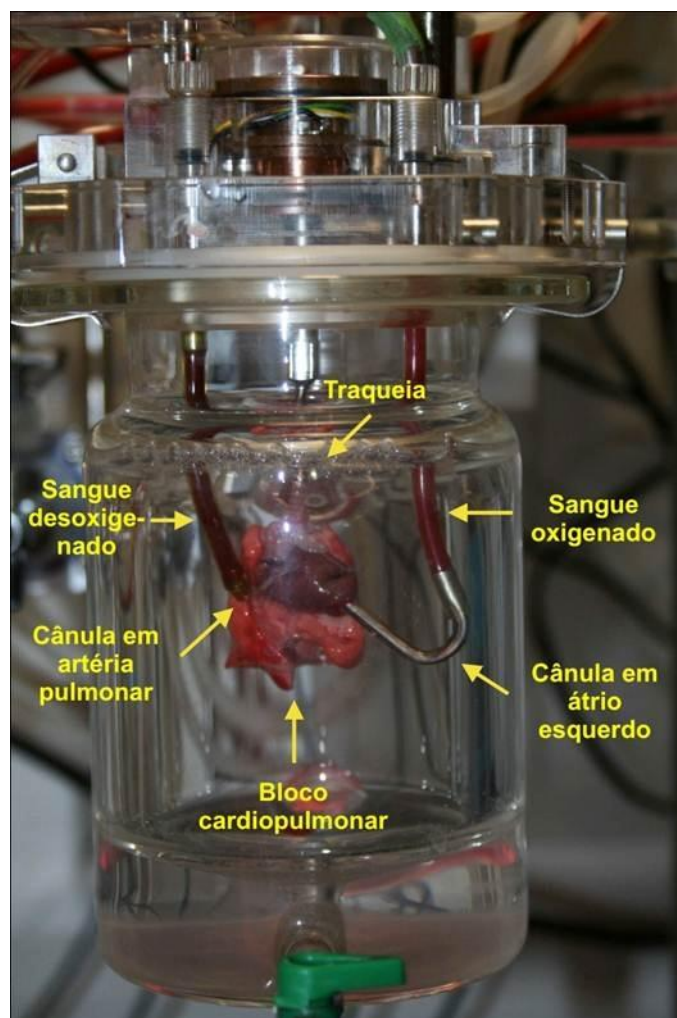


Figura 5. Bloco cardiopulmonar adaptado ao aparelho de perfusão/ventilação pulmonar ex-vivo Harvard Apparatus IL-2

A seguir, a câmara de pressão negativa foi fechada e a ventilação pulmonar iniciada com cerca de 25% do volume corrente planejado, FR de 60 ciclos/min, relação inspiração/expiração de 60% e um suspiro/minuto com 50% de acréscimo do volume corrente, o qual foi aumentado lentamente ao longo do tempo de 10 minutos da reperusão até atingir 10 ml/kg de peso. Concomitantemente, o fluxo da perfusão, mantido inicialmente em 2 ml/min, foi aumentado lentamente ao longo dos 5 a 10

minutos iniciais, até atingir o fluxo de 5 a 7 ml/min, mantendo-se a pressão na artéria pulmonar, fornecida pelo aparelho, entre 10 e 15 mmHg. A reperfusão foi mantida pelo tempo previsto de 60 minutos. A Figura 6 ilustra o circuito da perfusão pulmonar ex-vivo.

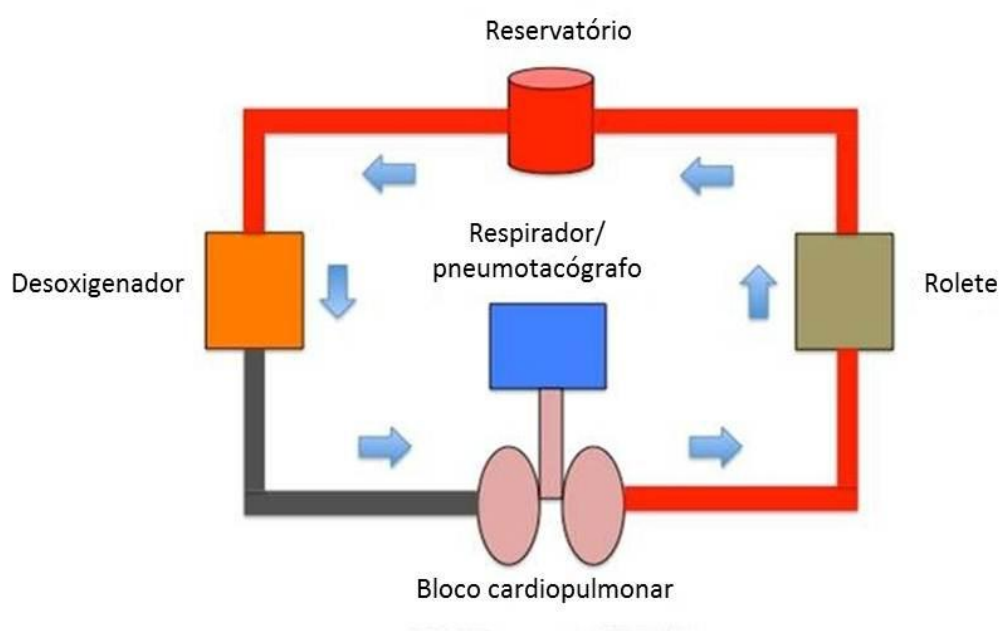


Figura 6. Esquema simplificado do circuito da perfusão pulmonar ex-vivo

4.4 Avaliação funcional

A cada 10 minutos da reperfusão, amostras de sangue (0,3ml) foram coletadas pelas cânulas arterial pulmonar e atrial esquerda para análise gasométrica (ABL 800, Radiometer, Dinamarca), hematócrito e eletrólitos. Ao mesmo tempo, os dados de mecânica ventilatória e de hemodinâmica, fornecidos pelo aparelho e

utilizados em nosso estudo (volume corrente, frequência respiratória, complacência, e pressão de artéria pulmonar), além do peso do bloco cardiopulmonar, foram registrados em protocolo próprio (Anexo).

Para avaliação da habilidade de oxigenação dos pulmões reperfundidos, utilizamos o índice Capacidade Relativa de Oxigenação (CRO), que é obtido a partir da fórmula $CRO = [(PvO_2 - PaO_2) \times 100] / PaO_2$, na qual convencionou-se como PaO_2 o sangue desoxigenado coletado na cânula da artéria pulmonar e PvO_2 o sangue oxigenado coletado da cânula atrial esquerda. A CRO foi o índice utilizado nos experimentos com modelos ex-vivos em ratos realizados pelos pesquisadores da Hannover Medical School (Alemanha)^{28,29}. Esse índice busca fazer uma relação entre a PO_2 do sangue desoxigenado e a PO_2 do sangue oxigenado pelos pulmões de ratos reperfundidos neste modelo, o que em nossa opinião oferece uma avaliação satisfatória da capacidade de oxigenação.

O pH do perfusato sanguíneo foi corrigido com bicarbonato de sódio (0,3 mEq/L/dose) em quantidade suficiente para mantê-lo entre 7,1 e 7,4 a cada 10 minutos, conforme o resultado da gasometria.

Ao final de cada reperfusão, o pulmão esquerdo foi removido do bloco cardiopulmonar para determinação da razão de peso úmido/seco, utilizando-se o peso fresco do pulmão retirado e seu peso após acondicionamento por 48 horas a 70°C. A opção pelo uso do pulmão esquerdo se deu pela característica anatômica de ser formado por um único lobo, ao contrário do pulmão direito.

4.5 Avaliação anatomopatológica

Após o término da reperfusão, o pulmão direito foi removido do bloco cardiopulmonar e imerso em solução de formol a 10% neutra e tamponada, durante 24 horas, sendo então seccionado em direção longitudinal, com seleção da metade volumetricamente mais significativa para inclusão e processamento. A amostra foi desidratada, diafanizada e incluída em parafina. Cortes histológicos com 5µm de espessura foram submetidos à coloração por hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscopia óptica. Foi realizada uma análise histopatológica dos fragmentos obtidos, que identificou a presença ou ausência de: congestão, edema alveolar, hemorragia (alveolar e/ou intersticial), trombose aguda e infiltrado inflamatório intersticial (mononuclear e/ou granulocitário).

4.6 Avaliação pela microscopia eletrônica de transmissão

Ao término da reperfusão, quatro pequenos fragmentos do lobo superior do pulmão esquerdo (medindo aproximadamente 2mm x 2mm) foram utilizados para avaliação com microscopia eletrônica de transmissão. O material foi colocado em fixador universal (glutaraldeído a 1%, paraformaldeído a 1%, pH=7,4) imediatamente após a biópsia e pós-fixados em tetróxido de ósmio (2%), desidratados e embebidos em epon-araldite. Foram realizados cortes de 1µm analisados em microscópio eletrônico de transmissão, a fim de avaliar qualitativamente as alterações de pneumócitos tipo II, células endoteliais e formação

de edema. A avaliação pela microscopia eletrônica teve como propósito a ilustração destes achados.

4.7 Avaliação pelo método TUNEL

Imediatamente após a reperfusão, foram obtidos fragmentos do pulmão esquerdo, tendo por finalidade a detecção e quantificação de células apoptóticas, usando o *In situ Cell Death Detection Kit* (Roche, Mannheim, Alemanha). Os fragmentos 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. 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, foi feita a lavagem das lâminas com dois banhos (3 minutos cada) em PBS (*phosphate-buffered saline*). Elas foram, então, incubadas com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,3% e metanol por 30 minutos em temperatura ambiente, e, logo após, lavadas duas vezes em PBS. Na sequência, foram 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 foram colocadas em câmara úmida a 37°C por 60 minutos. Por fim, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS e preparadas com glicerina e lamínula de vidro para análise em microscópio de fluorescência.

4.8 Análise estatística

4.8.1 Análise estatística descritiva

Foram realizadas análises descritivas para os dados quantitativos com distribuição normal, apresentando as médias acompanhadas dos respectivos erros padrão. Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados, respectivamente, com o teste de Shapiro-Wilk e com o teste de Levene. As variáveis categóricas foram apresentadas através de suas frequências e percentagens.

4.8.2 Análise estatística inferencial

Para as variáveis quantitativas dependentes em que foram analisados dois fatores (tipo de solução de preservação e tempo de isquemia), foi utilizada análise de duplo fator no modelo linear geral. Para comparações múltiplas de médias, utilizou-se o teste de Bonferroni. Para comparação de proporções foi utilizado o teste do qui-quadrado.

Foi considerada uma probabilidade de erro do tipo I (α) de 0,05 em todas as análises inferenciais.

As análises estatísticas descritivas e inferenciais foram executadas com o software SPSS versão 13 (SPSS 13.0 for Windows).

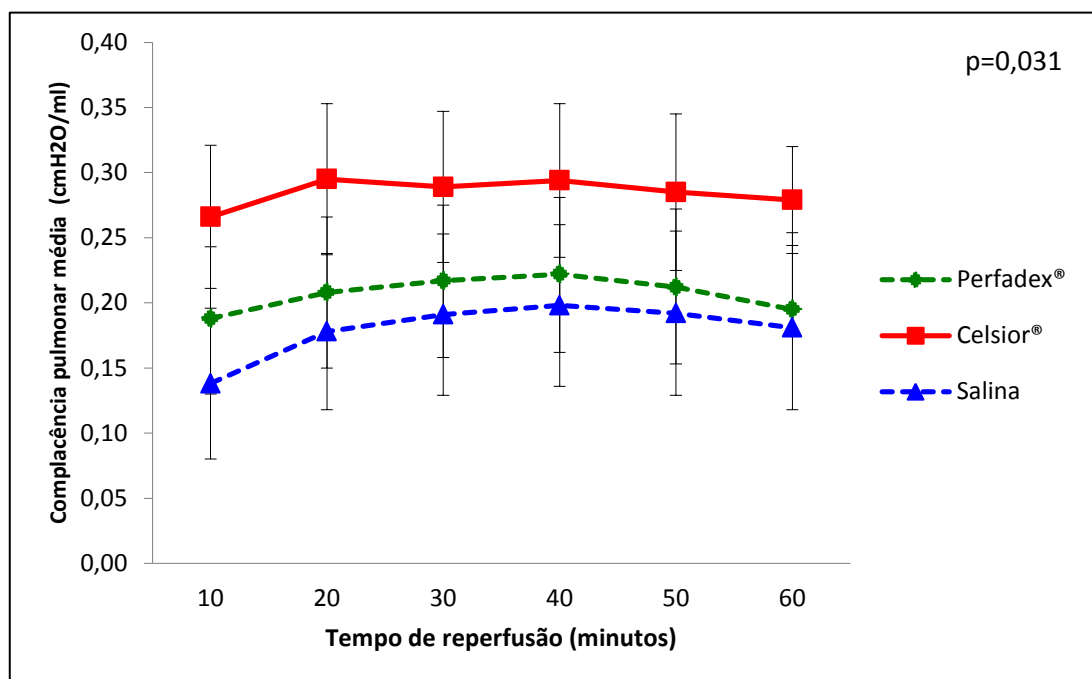
O peso corporal dos animais doadores de blocos cárdio-pulmonares variou entre 226 a 416 gramas (média de 298 ± 40 gramas).

5.1 Avaliação funcional pulmonar e mecânica ventilatória

5.1.1 Complacência pulmonar

A comparação entre Celsior® e Perfadex® nos dois tempos de isquemia de 6 e 12 horas não apresentou significância estatística ($p=0,161$ e $p=0,316$, respectivamente). A comparação entre Celsior® e Salina no tempo de isquemia de 6 horas apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,037$), porém não no tempo de isquemia de 12 horas ($p=0,072$) (Gráfico 1 e Gráfico 2). As comparações múltiplas estão evidenciadas na Tabela 2.

Gráfico 1. Complacência pulmonar média ao longo da reperfusão no tempo de isquemia de 6 horas

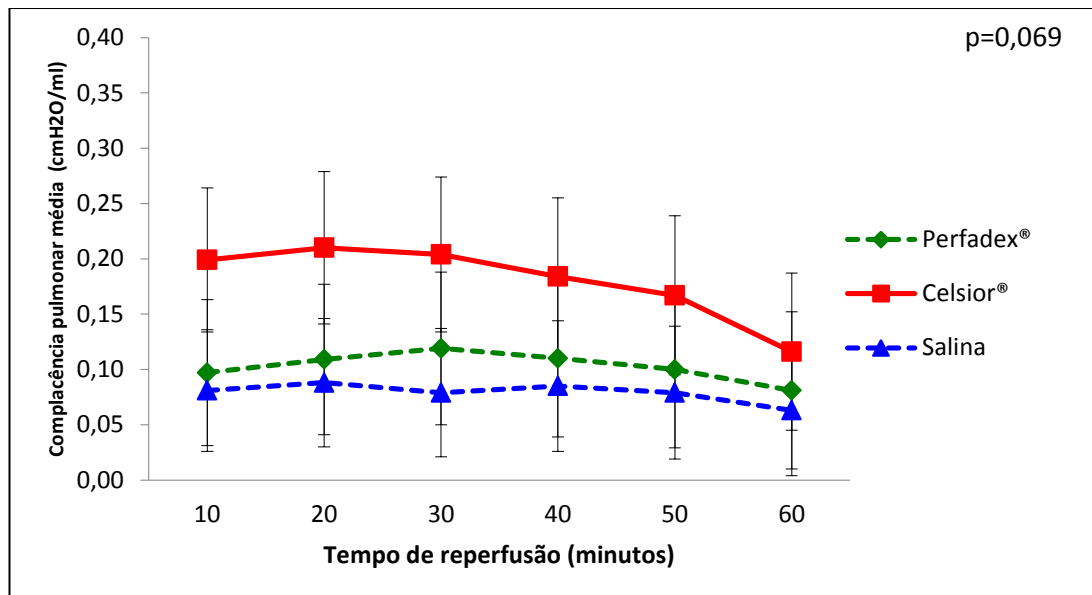


Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

Tabela 2. Comparações (média e erro padrão) das complacências pulmonares no tempo de isquemia de 6 horas

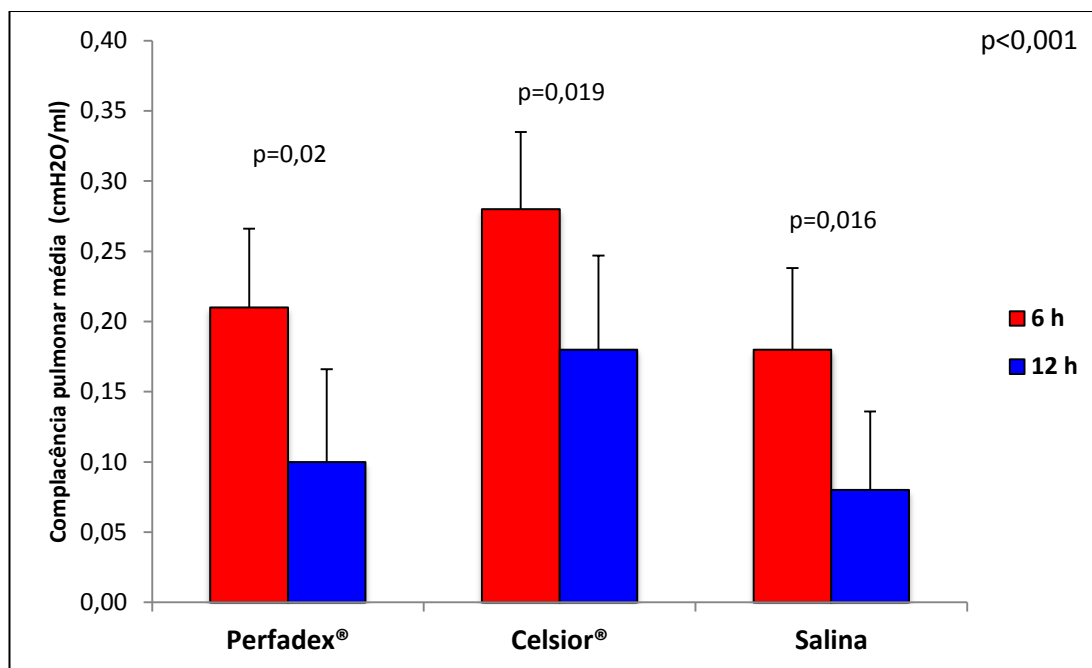
Comparações múltiplas	
Celsior® x Perfadex®	p=0,161
Celsior® x Salina	p=0,037
Perfadex® x Salina	p=1,0

Gráfico 2. Complacência pulmonar média ao longo da reperfusão no tempo de isquemia de 12 horas



Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

Todos os pulmões submetidos a 6 horas de isquemia apresentaram complacência pulmonar superior aos de 12 horas (Perfadex® p=0,02; Celsior® p=0,019; Salina p=0,016) (Gráfico 3).

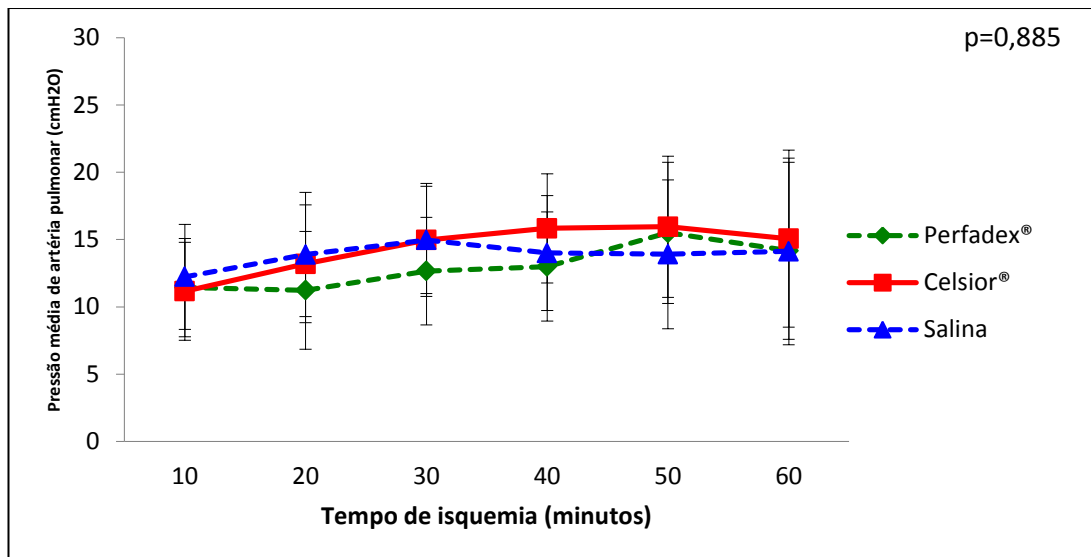
Gráfico 3. Complacência pulmonar média nos tempos de isquemia de 6 e 12 horas

Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

5.1.2 Pressão de artéria pulmonar

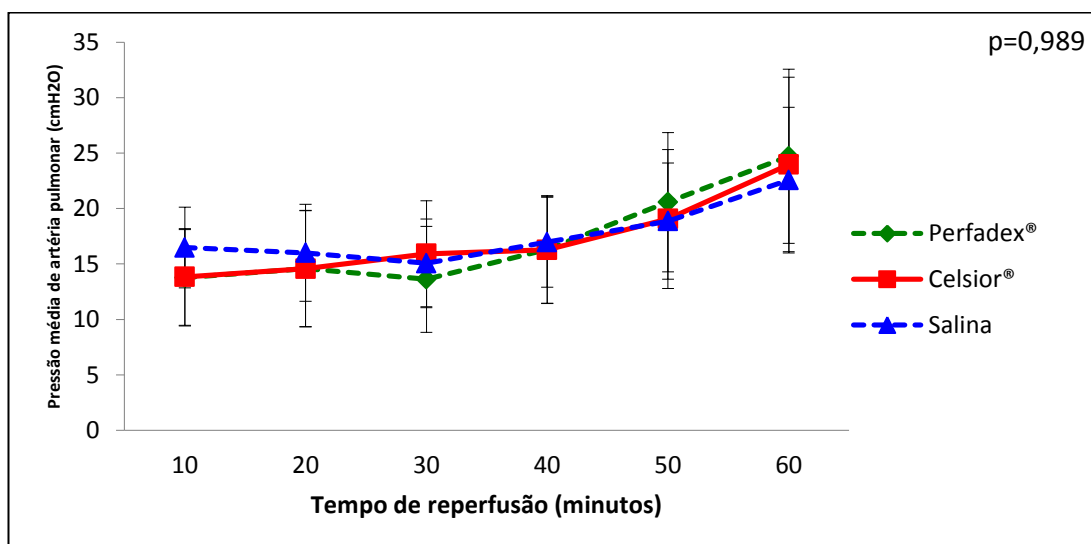
Os valores pressóricos de artéria pulmonar foram semelhantes entre as três soluções nos dois tempos de isquemia, bem como na comparação entre os tempos de 6 e 12 horas, independentemente da solução (Gráfico 4, Gráfico 5 e Gráfico 6).

Gráfico 4. Pressão média de artéria pulmonar ao longo da reperfusão no tempo de isquemia de 6 horas



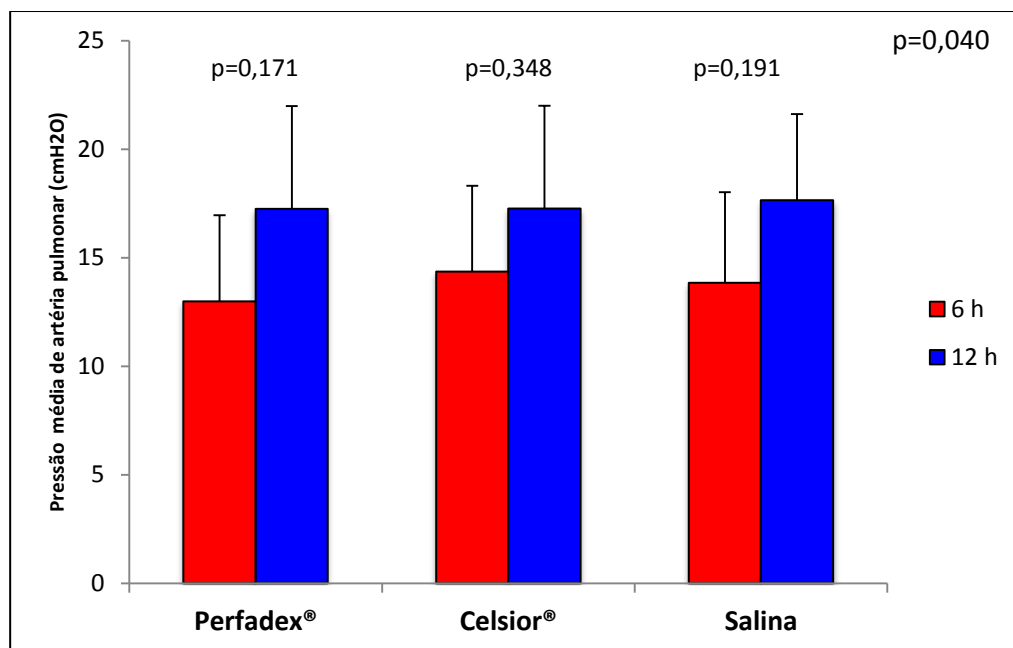
Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

Gráfico 5. Pressão média de artéria pulmonar ao longo da reperfusão no tempo de isquemia de 12 horas



Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

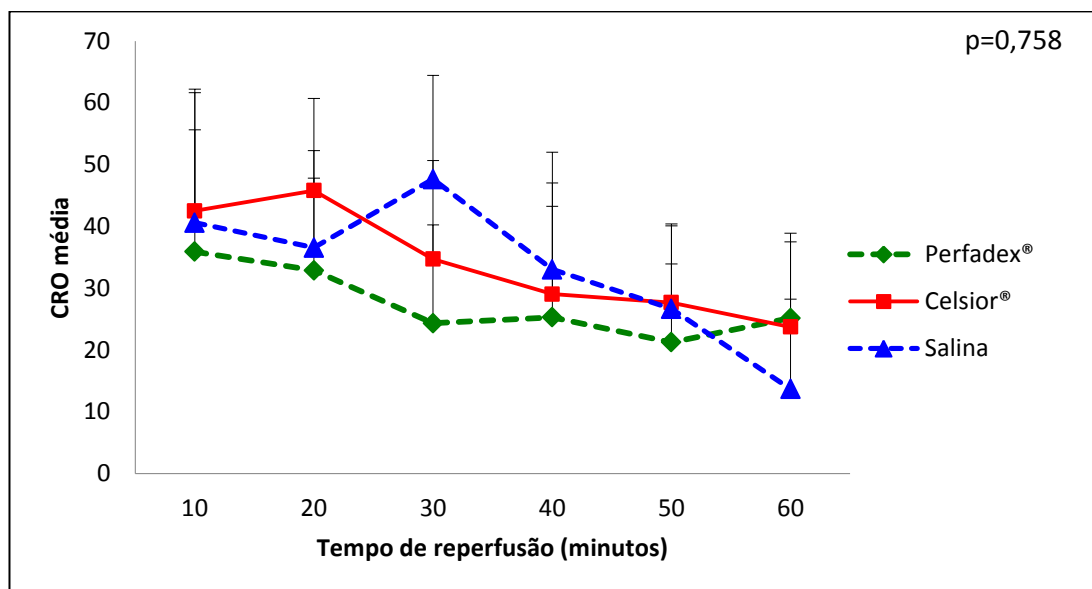
Gráfico 6. Pressão de artéria pulmonar nos tempos de isquemia de 6 e 12 horas



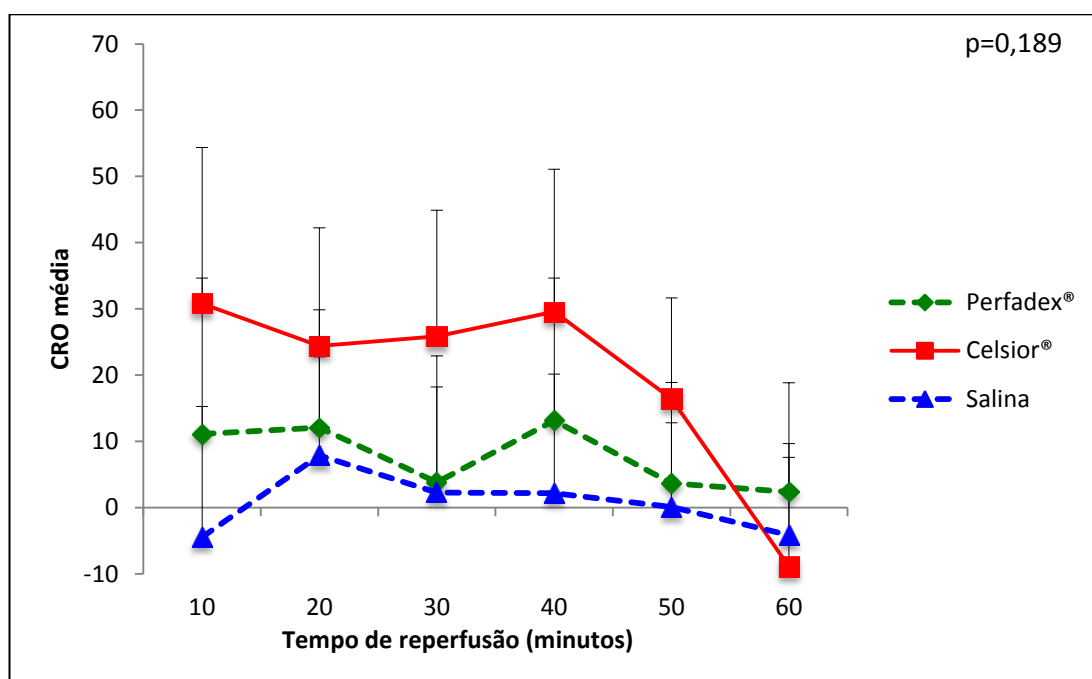
Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

5.1.3 Capacidade relativa de oxigenação (CRO)

A CRO não demonstrou diferença estatística entre as três soluções, independentemente do tempo de isquemia, apesar de Celsior® apresentar valores superiores de CRO em relação a Perfadex® e Salina nos primeiros minutos da reperfusão após 12 horas de isquemia (Gráfico 7 e Gráfico 8).

Gráfico 7. CRO média no tempo de isquemia de 6 horas

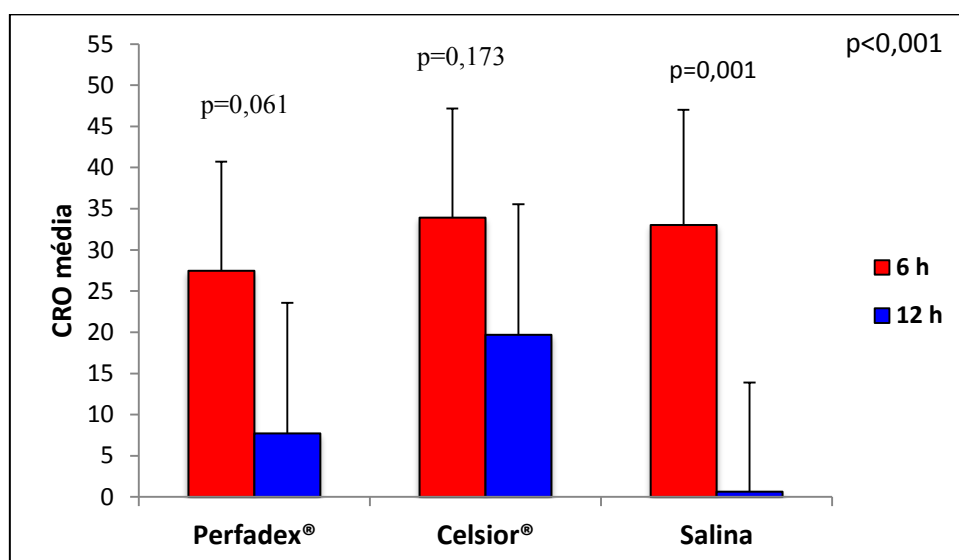
Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

Gráfico 8. CRO média no tempo de isquemia de 12 horas

Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

Na comparação entre os dois tempos de isquemia, o desempenho da oxigenação foi significativamente pior nos pulmões preservados com Salina por 12 horas, ao passo que não se observaram diferenças significativas entre os pulmões preservados com Celsior® ou Perfadex® ($p=0,061$ e $p=0,173$, respectivamente) (Gráfico 9).

Gráfico 9. CRO média dos pulmões submetidos a 6 e 12 horas de isquemia

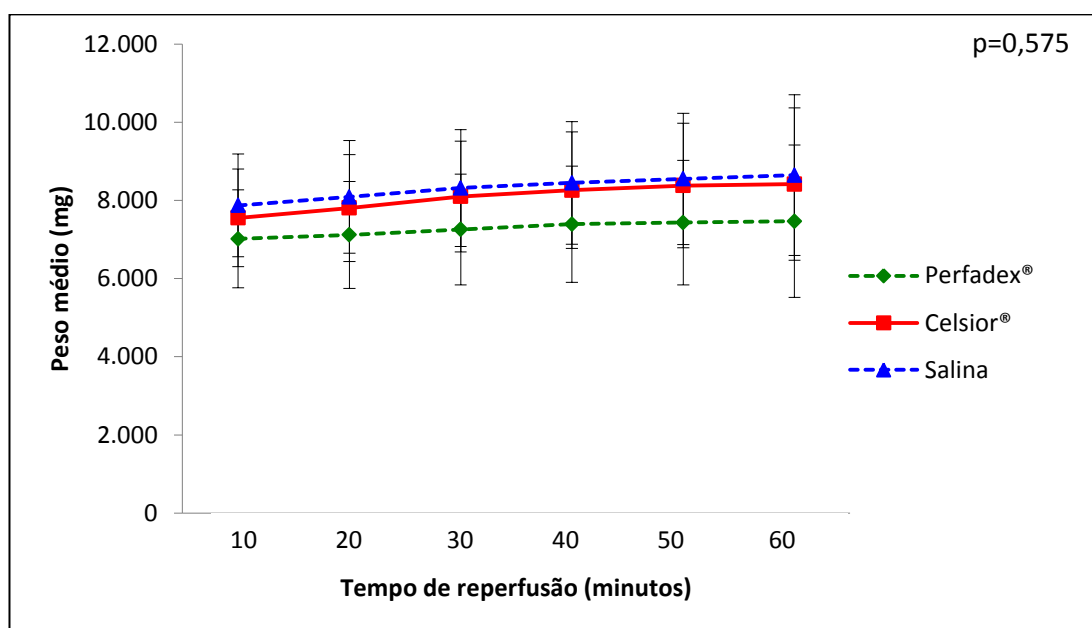


Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

5.1.4 Peso do bloco cardiopulmonar ao longo da reperfusão

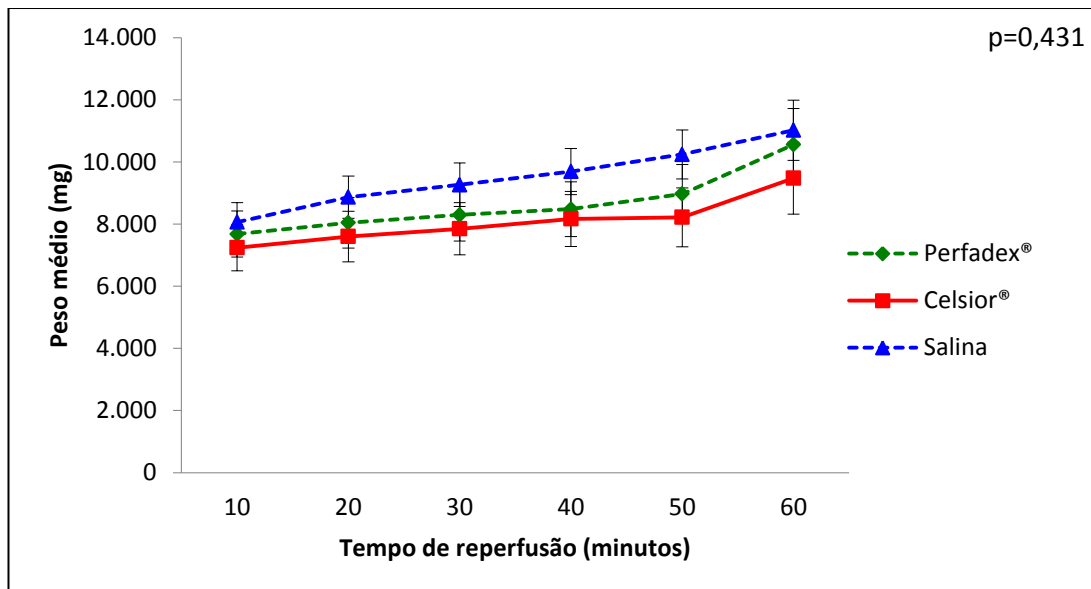
Todos os pulmões apresentaram ganho de peso ao longo do tempo de reperfusão, independentemente da solução e do período de isquemia, porém esses valores foram semelhantes entre as três soluções nos dois tempos, bem como na comparação entre 6 e 12 horas de isquemia (Gráfico 10, Gráfico 11 e Gráfico 12).

Gráfico 10. Peso médio do bloco cardiopulmonar ao longo da reperfusão no tempo de isquemia de 6 horas



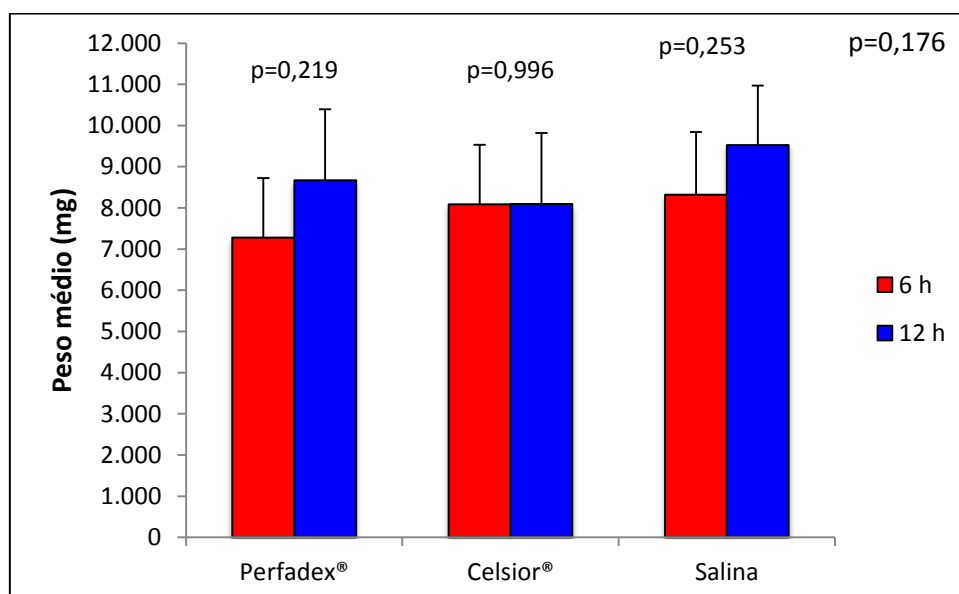
Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

Gráfico 11. Peso médio do bloco cardiopulmonar ao longo da reperfusão no tempo de isquemia de 12 horas



Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

Gráfico 12. Peso médio do bloco cardiopulmonar dos pulmões submetidos a 6 e 12 horas de isquemia

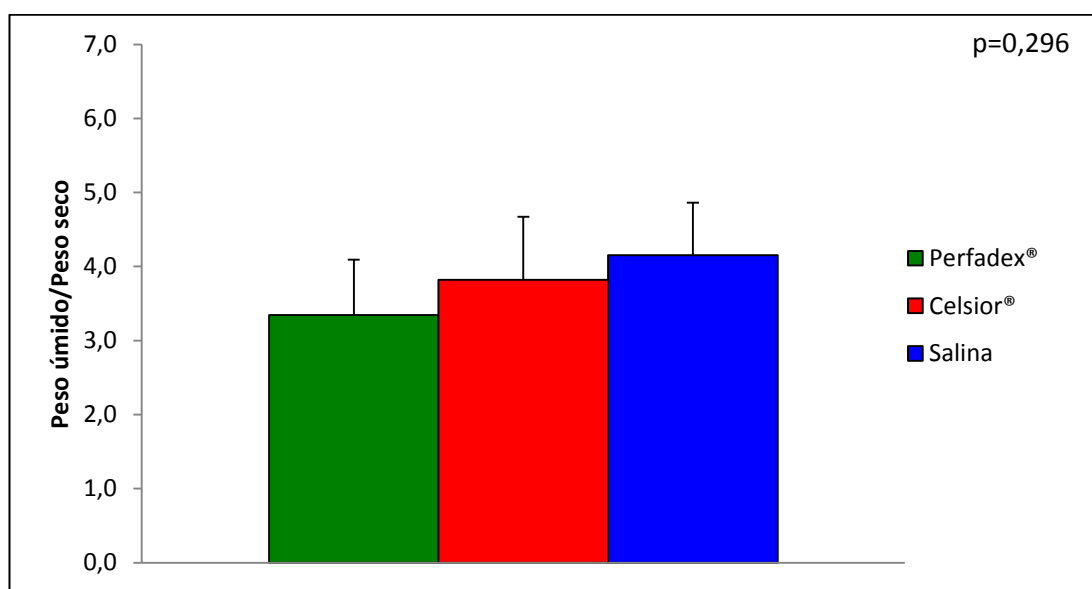


Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

5.1.5 Razão peso úmido/peso seco

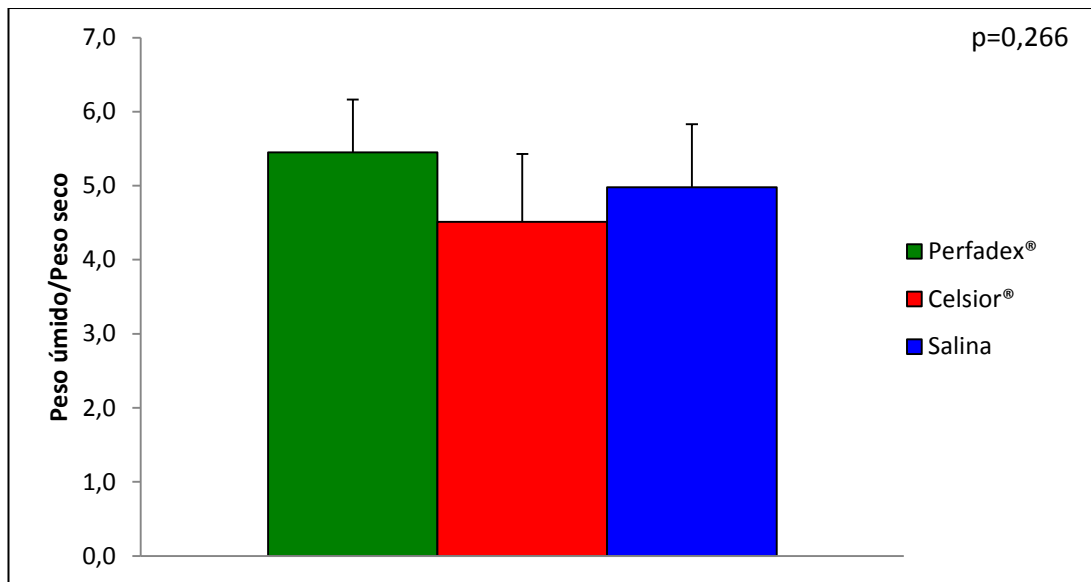
A razão peso úmido/peso seco não apresentou diferença estatística significativa entre as três soluções nos dois tempos de isquemia (Gráfico 13 e Gráfico 14).

Gráfico 13. Razão peso úmido/peso seco dos pulmões submetidos a 6 horas de isquemia



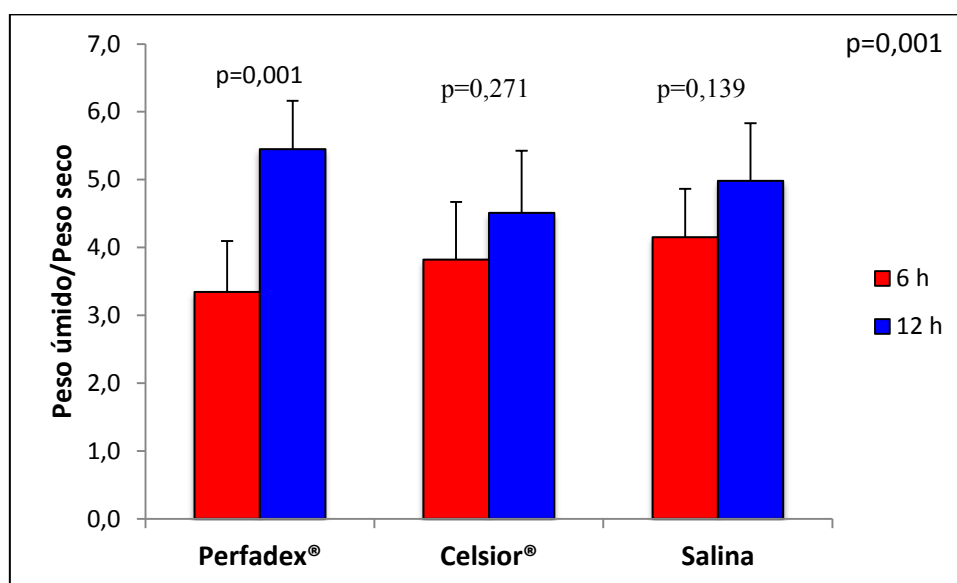
Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

Gráfico 14. Razão peso úmido/peso seco dos pulmões submetidos a 12 horas de isquemia



Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

Na comparação entre os tempos de isquemia de 6 e 12 horas, Perfadex® evidenciou maior ganho de peso no tempo de isquemia mais longo. Nas demais soluções esta diferença não foi significativa (Celsior®, $p=0,27$; Salina, $p=0,13$) (Gráfico 15).

Gráfico 15. Razão peso úmido/peso seco nos tempos de isquemia de 6 e 12 horas

Nota: As barras de erro correspondem ao erro padrão da média.

5.2 Avaliação pela microscopia óptica

À microscopia óptica, observou-se que pulmões preservados com Salina apresentaram mais edema que os demais, independentemente do tempo de isquemia a que foram submetidos. Na comparação entre Celsior® e Perfadex®, não houve diferença significativa em relação ao edema alveolar, independentemente do tempo de isquemia (Gráficos 16 e 17).

Gráfico 16. Comparação entre os grupos quanto à presença de edema alveolar no tempo de isquemia de 6 horas. Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre Perfadex® e Celsior® ($p=0,131$)

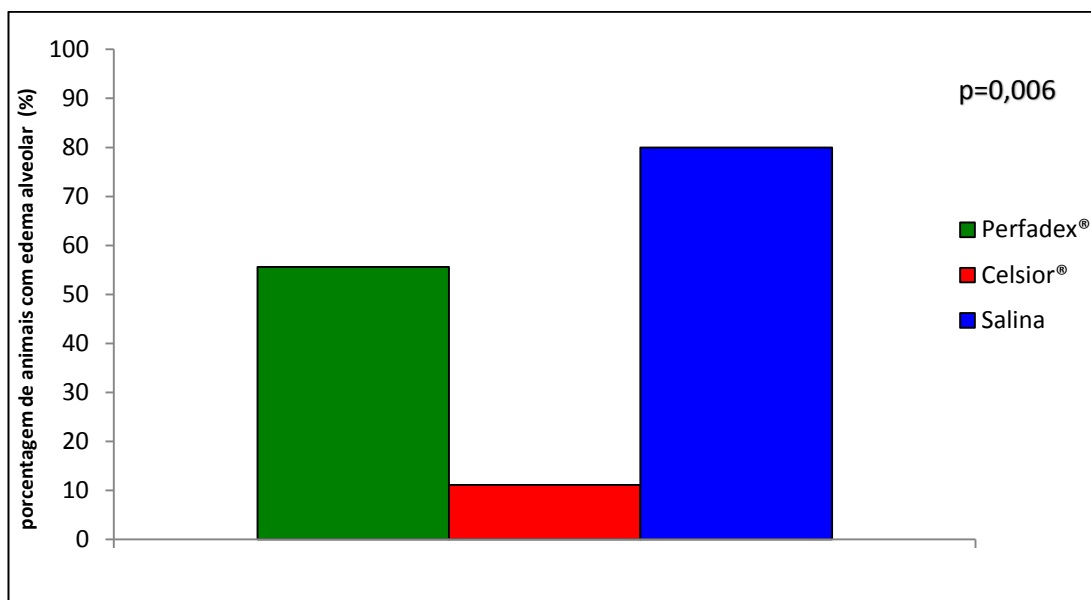
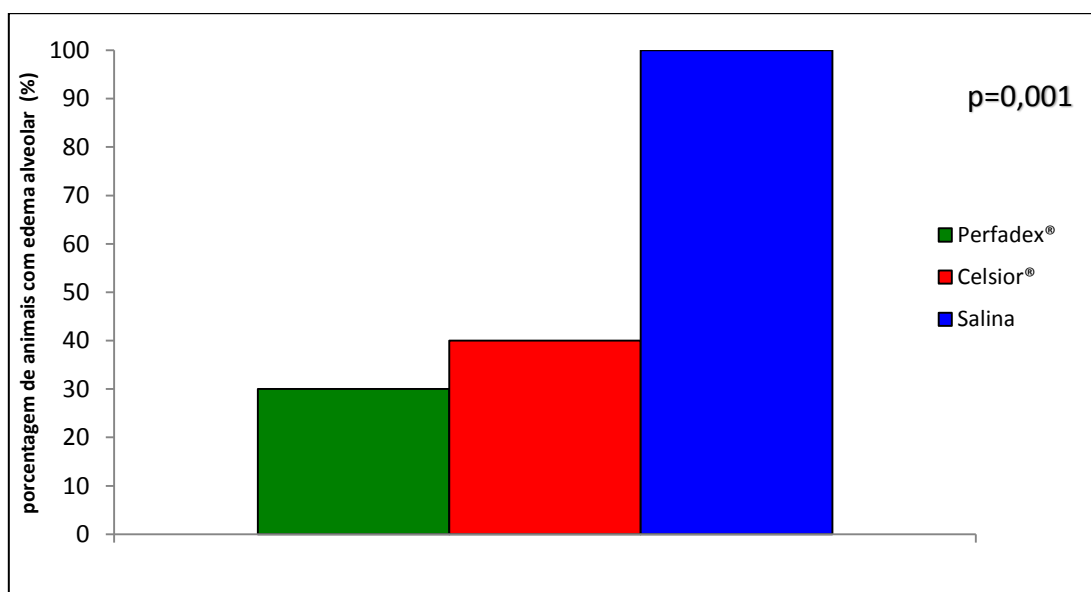
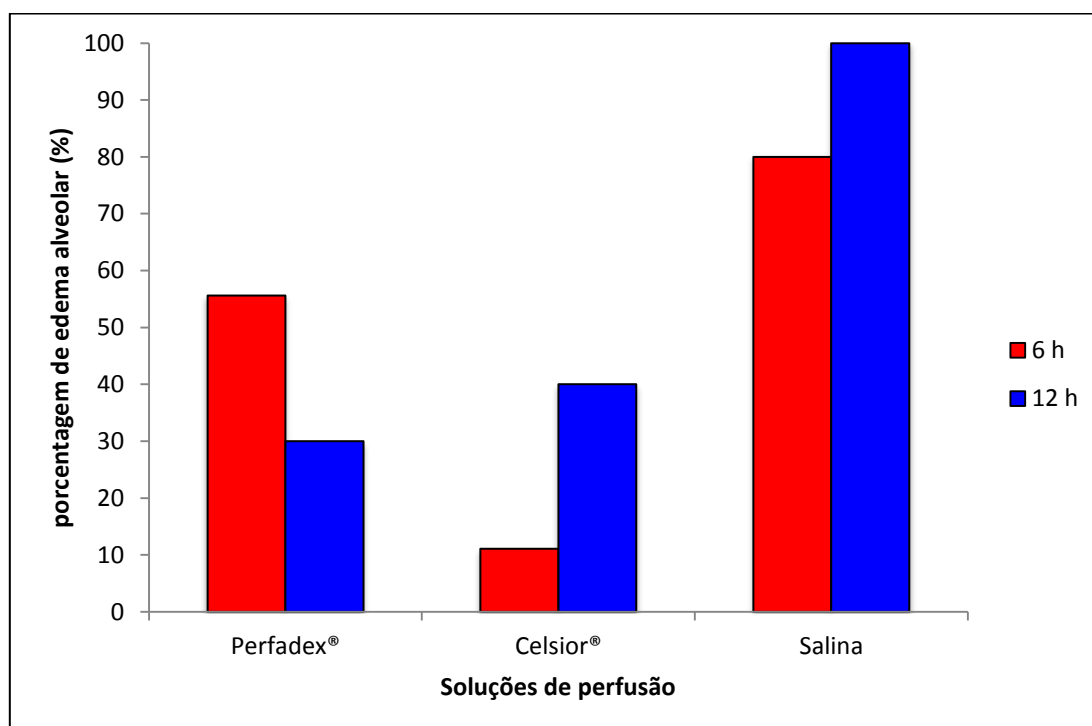


Gráfico 17. Comparação entre os grupos quanto à presença de edema alveolar no tempo de isquemia de 12 horas. Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre Perfadex® e Celsior® ($p=1,00$)



Na comparação entre os tempos de isquemia de 6 e 12 horas, não houve diferença estatística entre as três soluções (Gráfico 18).

Gráfico 18. Comparação entre os grupos quanto à presença de edema alveolar nos tempos de isquemia de 6 e 12 horas. Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre as três soluções (Perfadex® $p=0,370$; Celsior® $p=0,303$; Salina $p=0,474$)



Os demais parâmetros patológicos avaliados não demonstraram diferença significativa na comparação entre as soluções nos tempos de isquemia de 6 ou 12 horas (Tabela 3 e 4), bem como na comparação intergrupos das três soluções quanto aos tempos de isquemia (Tabela 5).

Tabela 3. Valores da significância verificados na análise patológica e comparação dos grupos submetidos às diferentes soluções de preservação após 6 horas de isquemia

Celsior® (6h) x Perfadex® (6h) x Salina (6h)	
Variável	Significância
Congestão	0,888
Hemorragia Alveolar	0,104
Hemorragia Intersticial	0,345
Trombose Aguda	0,443
Infiltrado Eosinofílico	0,786
Infiltrado Inflamatório	0,703
Infiltrado Intersticial	0,361

Tabela 4. Valores da significância verificados na análise patológica e comparação dos grupos submetidos às diferentes soluções de preservação após 12 horas de isquemia

Celsior® (12h) x Perfadex® (12h) x Salina (12h)	
Variável	Significância
Congestão	0,135
Hemorragia Alveolar	0,278
Hemorragia Intersticial	0,943
Trombose Aguda	0,092
Infiltrado Eosinofílico	0,278
Infiltrado Inflamatório	0,441
Infiltrado Intersticial	0,315

Tabela 5. Valores da significância verificados na análise patológica e comparação dos grupos submetidos aos diferentes tempos de isquemia

Celsior® x Perfadex® x Salina			
Variável	Significância		
	Perfadex® (6h)	Celsior® (6h)	Salina (6h)
	vs	vs	vs
	Perfadex®(12h)	Celsior® (12h)	Salina (12h)
Congestão	0,37	1	0,37
Edema Alveolar	0,37	0,303	0,474
Hemorragia Alveolar	0,087	0,582	1
Hemorragia Intersticial	0,087	0,087	0,303
Trombose Aguda	0,211	0,474	1
Infiltrado Eosinofílico	0,656	0,141	0,17
Infiltrado Inflamatório	0,35	0,628	0,582
Infiltrado Intersticial	0,303	0,628	1

As figuras abaixo demonstram os principais aspectos histopatológicos identificados.

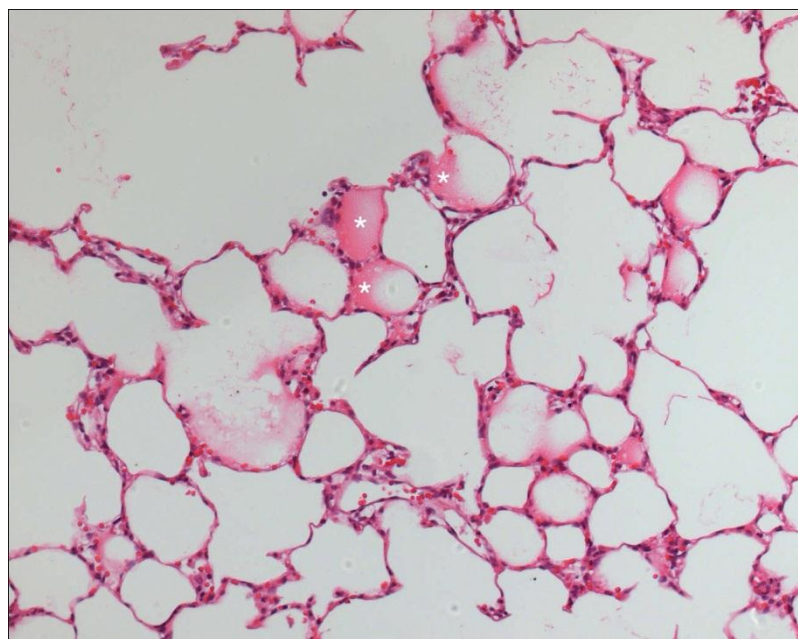


Figura 7. Lâmina de parênquima pulmonar preservado com Perfadex® e submetido a isquemia por 6 horas. Apresenta focos de discreto edema alveolar (asteriscos). Achados semelhantes foram encontrados nos pulmões perfundidos com Celsior® (Hematoxilina-eosina, 200X).

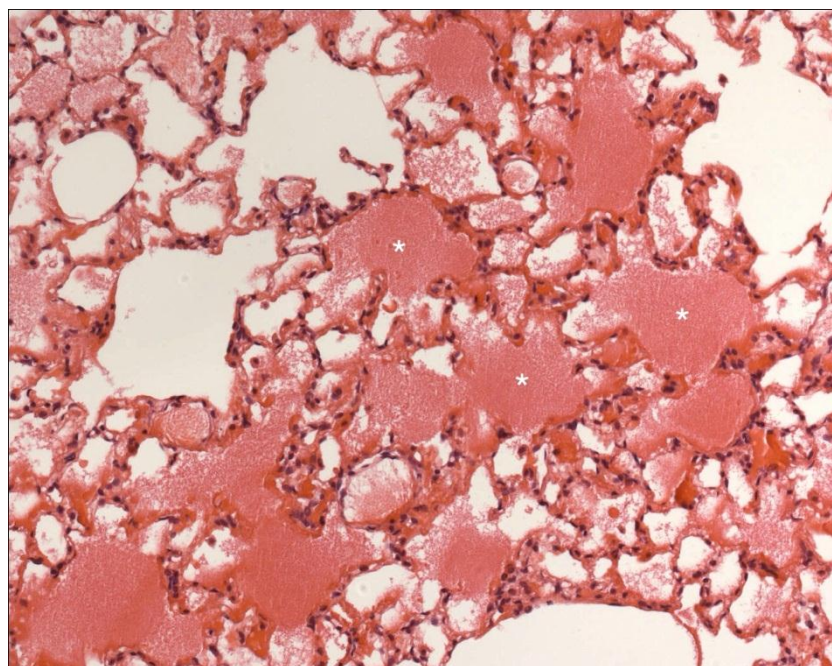


Figura 8. Lâmina de parênquima pulmonar preservado com solução salina e submetido a isquemia por 6 horas, apresentando congestão capilar e acentuado edema alveolar, asteriscos (Hematoxilina-eosina, 200X).

5.3 Avaliação pela microscopia eletrônica

A avaliação qualitativa dos preparados para microscopia eletrônica evidenciou raras células epiteliais e endoteliais, cuja cromatina se mostra grosseiramente agregada na periferia nuclear, sugerindo tratar-se de fase inicial de processo de apoptose. Além disso, foi observado discreto espessamento focal da membrana basal à custa de edema. A Figura 9 demonstra estes achados.

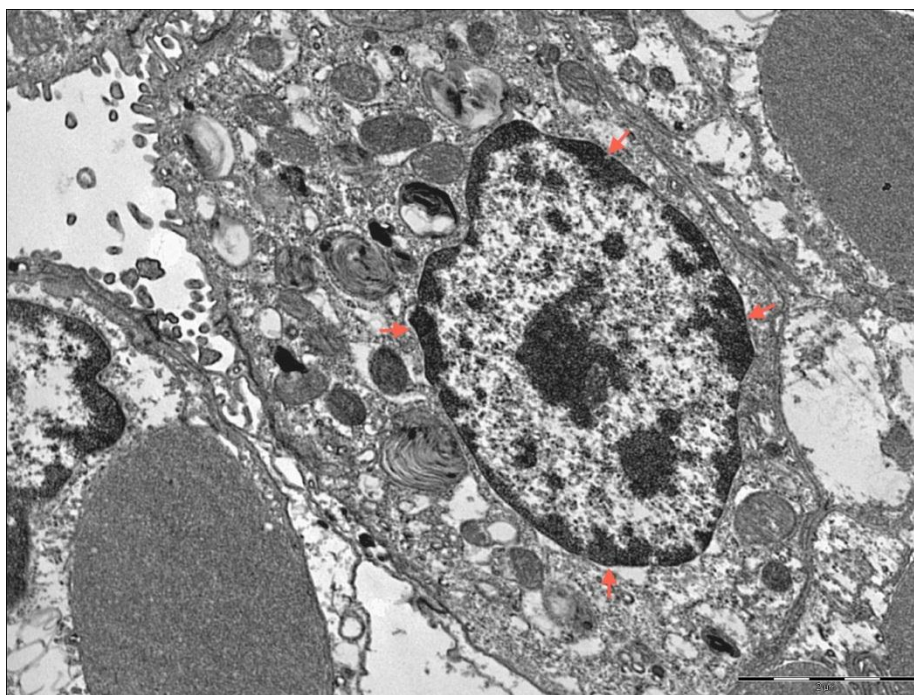


Figura 9. Pneumócito apresentando tendência a agregação periférica da cromatina, compatível com processo apoptótico, setas (Microscopia eletrônica de transmissão, 8900X).

5.4 Avaliação pelo método TUNEL

A avaliação da apoptose celular por meio do método de TUNEL não mostrou diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos, independentemente da solução utilizada e do tempo de isquemia a que os pulmões foram submetidos. A Figura 9 ilustra um dos campos utilizados na contagem de células apoptóticas.

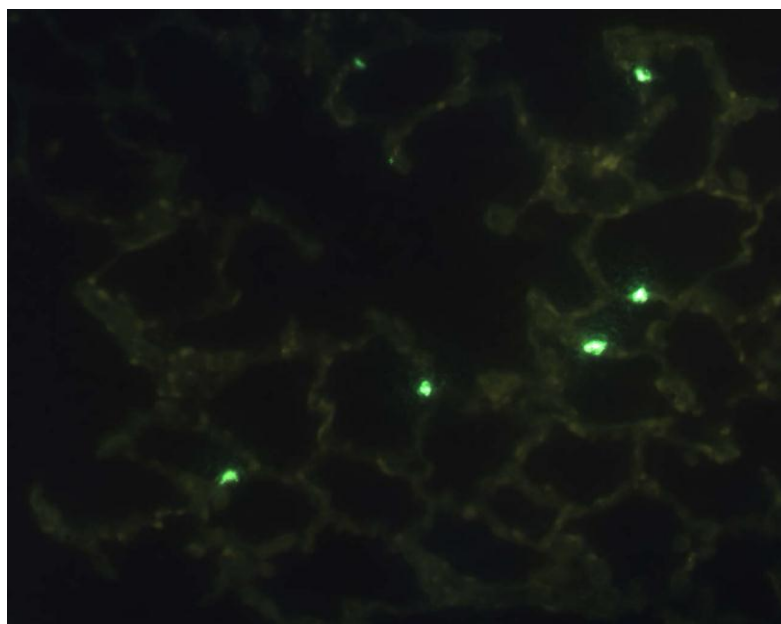


Figura 10. Imagem de microscopia de imunofluorescência (TUNEL) para avaliação de apoptose celular. As células marcadas com fluorescência (verdes) são exemplares do tecido que sofreram apoptose.

A preservação pulmonar para transplantes permitiu a captação de órgãos à distância e melhorou objetivamente a qualidade dos órgãos após a reperfusão, reduzindo a lesão pós-isquêmica. A lesão de reperfusão é hoje reconhecida como fator limitante da viabilidade dos órgãos doados, tendo sido implicada como importante fator coadjuvante no desenvolvimento de bronquiolite obliterante tardiamente⁴. Os métodos de preservação mais utilizados permanecem sendo a hipotermia associada à administração de soluções de preservação adicionadas ou não aos vasodilatadores pulmonares^{63,84}. O desenvolvimento de soluções de preservação exclusivas para uso pulmonar reduziu de 30% para menos de 15% a incidência de falência aguda do enxerto⁵. Mais recentemente, a introdução do condicionamento pulmonar ex-vivo e a doação pós-parada cardiocirculatória vieram reacender as controvérsias e reforçar a necessidade de reavaliação das soluções de preservação em uso^{85,86}.

Utilizamos-nos deste modelo de perfusão pulmonar ex-vivo (IL-2 - *Isolated Perfused Rat or Guinea Pig Lung System*) por nos parecer adequado para uma avaliação inicial²². O sistema de perfusão ex-vivo é simples e há muito tem sido utilizado em estudos de preservação pulmonar para transplante, por ser confiável e de baixo custo. Diferentemente de outros autores, que utilizavam sangue bovino com hemácias lavadas⁸⁷, nossa opção foi a de utilizar sangue homólogo obtido por exsanguinação de dois a três ratos por bloco cardiopulmonar e diluído em solução salina, o que é aparentemente mais fisiológico e, conseqüentemente, leva a menor reação celular e rejeição. Apesar de a hemodiluição interferir nas trocas gasosas,

obtivemos resultados confiáveis e coerentes no que se refere à oxigenação dos tecidos estudados.

Utilizamos em nosso estudo tempos de isquemia maiores (6 e 12 horas) em comparação ao de outros autores (2 e 4 horas) que utilizaram modelo experimental semelhante^{28,29}. Consideramos que tempos de isquemia maiores neste tipo de estudo permitem uma melhor avaliação do desempenho da solução de preservação sobre os efeitos do mecanismo de isquemia-reperfusão. Devemos observar, ainda, que os modelos anteriores de estudo ex-vivo não permitiam reperfusão mais prolongada.

Neste estudo não encontramos diferenças significativas entre as soluções Perfadex® e Celsior®, as quais apresentaram desempenho similar em relação aos parâmetros analisados.

A análise dos dados de complacência pulmonar não demonstrou superioridade de uma solução sobre a outra nos dois tempos de isquemia (6 horas e 12 horas). Sommer et al. Observaram, em um modelo suíno, valores de complacência pulmonar comparáveis em ambos os grupos experimentais após um período de isquemia fria de 24 horas e 7 horas de reperfusão⁷⁹. Wittwer et al., também em modelo suíno, observaram que a complacência pulmonar dinâmica permanecera estável durante a reperfusão de 6 horas, mesmo após 27 horas de isquemia hipotérmica. Os autores não demonstraram diferença significativa entre as duas soluções, independentemente da via de perfusão. Entretanto, a preservação com a solução Celsior® levou a valores de complacência pulmonar inferiores dentre todos os grupos analisados⁸⁰. Já em nosso estudo, apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa, Celsior® relacionou-se à melhor complacência pulmonar durante a reperfusão.

As soluções testadas relacionaram-se à complacência pulmonar significativamente inferior após 12 horas de isquemia, indicando que tempos de isquemia mais longos possuem impacto negativo na complacência pulmonar, independentemente da solução utilizada na preservação.

Na avaliação dos valores pressóricos de artéria pulmonar, não houve diferença na comparação entre as três soluções nos dois tempos de isquemia e, como era esperado, os pulmões preservados por 12 horas apresentaram pressões de artéria pulmonar superiores aos preservados por 6 horas, porém sem diferença estatística significativa. Isto evidencia que nenhuma das três soluções foi capaz de proporcionar valores pressóricos inferiores às demais em tempo de isquemia mais longo. Wittwer et al.²⁹, em seu estudo em um modelo de perfusão pulmonar ex-vivo em ratos Sprague-Dawley com tempo de isquemia de 4 horas e 50 minutos de reperfusão, observaram que a solução Perfadex® apresentou valores de pressão de artéria pulmonar inferiores aos obtidos com a solução Celsior®, independente da administração anterógrada ou retrógrada do perfusato, porém sem diferença estatisticamente significativa.

Uma das limitações deste modelo utilizado reside no fato de não permitir o cálculo da resistência vascular pulmonar (RVP), o que proporcionaria uma melhor avaliação hemodinâmica da vasculatura do pulmão. Sommer et al., utilizando um modelo suíno com possibilidade de cálculo da RVP, encontraram uma diferença significativa entre Celsior® e Perfadex®, em que os animais tratados com Celsior® mantiveram baixos valores de RVP ao longo da reperfusão, enquanto os tratados com Perfadex® apresentaram uma elevação precoce substancial nos valores de RVP, permanecendo altos durante todo o período de observação⁷⁹. Já Wittwer et al.,

também em um modelo suíno com cálculo da RVP, observaram que os animais preservados com Celsior® apresentaram os mais elevados valores de RVP entre todos os grupos⁸⁰.

A Capacidade Relativa de Oxigenação (CRO) tem sido o método de quantificação de trocas gasosas neste modelo ex-vivo em pequenos animais, e provavelmente representa o parâmetro fisiológico mais importante. No presente estudo, não observamos diferenças significativas no desempenho das trocas gasosas dos pulmões preservados com Celsior® em relação aos preservados com Perfadex® em ambos os tempos de isquemia avaliados. Os resultados obtidos em outro estudo realizado em modelo similar, com tempo de isquemia de 4 horas, demonstraram diferenças entre as duas soluções favorecendo a solução Celsior®²⁸, devendo-se levar em consideração que em nosso estudo utilizamos um tempo de isquemia três vezes mais longo.

A solução salina evidenciou falência da capacidade de oxigenação em um tempo de isquemia mais longo. Entretanto, no tempo de isquemia de 6 horas tal solução apresentou valores de CRO superiores à solução Perfadex®, porém sem diferença estatisticamente significativa e com declínio da oxigenação ao longo da metade final da reperfusão. Esse fato pode ser atribuído à hemodiluição. A hemodiluição e seus efeitos benéficos sobre a lesão de reperfusão são conhecidos. Puskas et al. descreveram estes efeitos em modelo similar de perfusão ex-vivo, no qual a hemodiluição com solução cristalóide causava melhora significativa na lesão de isquemia-reperfusão⁸⁸. No presente modelo, a hemodiluição pode ter sido maior nos pulmões do grupo Salina, uma vez que estes pulmões já possuíam seu leito vascular preenchido com solução fisiológica antes da reperfusão. Isto poderia

justificar em parte os valores de CRO superiores nos pulmões preservados com a solução Salina do que com a solução Perfadex® no tempo de isquemia de 6 horas, em adição ao viés representado pela ausência do corpo do animal e a substituição deste pelo desoxigenador.

Nosso desenho experimental incluiu um grupo controle de solução salina, apesar de esta solução não ser empregada clínica ou experimentalmente na preservação pulmonar, como forma de avaliar a estabilidade e confiabilidade do modelo.

Devemos comentar, aqui, que existem, na literatura, relatos de alergia de ratos da raça Wistar ao dextram, um componente presente na fórmula da solução Perfadex®⁸⁹⁻⁹². Apesar destes relatos, utilizamos ratos desta raça em nossos experimentos pelas seguintes razões: a alergia ao dextram não é exclusiva da raça Wistar, ocorrendo também em outras raças, incluindo a Sprague-Dawley, muito utilizada por vários centros de pesquisa^{93,94}; o Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) tem facilidade no fornecimento dessa raça de ratos; e, outros trabalhos, apesar destes relatos, utilizaram preservação pulmonar com Perfadex® em ratos da raça Wistar, obtendo resultados consistentes⁹⁵⁻⁹⁸.

Na avaliação dos valores do peso do bloco cardiopulmonar ao longo da reperfusão, como parâmetro de evidência de edema pulmonar, observamos que todos os pulmões, independentemente do tempo de isquemia e da solução empregada, apresentaram ganho de peso ao longo da reperfusão. Isto reflete o edema progressivo causado pela lesão de reperfusão pós-isquêmica adicionada das características de fluxo não pulsátil e do próprio sistema de perfusão extracorpórea. No tempo de

isquemia de 6 horas os pulmões preservados com Perfadex® apresentaram menor ganho de peso do que aqueles preservados com Celsior®, porém sem diferença estatística significativa. Mühlfeld et al., em um trabalho com modelo suíno avaliando especificamente o edema pulmonar em vários níveis, concluiu que a solução Perfadex®, comparada ao Celsior®, efetivamente previne a formação de edema intra-alveolar, peribroncovascular e septal, bem como a injúria da barreira alvéolo-capilar durante o fenômeno de isquemia-reperfusão⁸¹. Já Sommer et al., em seu modelo em porcos, observaram que o conteúdo de água em pulmões preservados com Perfadex® não foi estatisticamente diferente quando comparado àqueles preservados com Celsior® após 24 horas de isquemia fria e 7 horas de reperfusão⁷⁹.

No tempo de isquemia de 12 horas, apesar de a diferença não ser significativa, Celsior® apresentou menor ganho de peso do que a solução Perfadex®, além de desempenho semelhante ao obtido no tempo de isquemia de 6 horas, o que pode sugerir a tendência desta solução em proporcionar menos edema pulmonar do que Perfadex® em um tempo de isquemia mais longo. Nos pulmões do grupo Salina preservados por 12 horas, os parâmetros foram consistentemente piores em relação às demais soluções no mesmo período de isquemia. Tal achado era esperado, uma vez que esta solução não é utilizada para preservação pulmonar por causar edema na reperfusão, sobretudo em tempos de isquemia prolongados.

Quando analisamos o índice de edema representado pela relação peso úmido e peso seco (U/S), observamos que o edema aumenta de modo diretamente proporcional ao tempo de isquemia, sendo um pouco menor nos pulmões preservados durante 6 horas com Perfadex®. Menos edema é uma característica

desta solução, e tem sido observada indistintamente da via de perfusão, tanto retrógrada quanto anterógrada⁸⁰.

O presente estudo evidenciou um desempenho similar na reperfusão em pulmões preservados com Perfadex® e Celsior®, o que pode ser evidenciado, também, pela avaliação das análises histopatológicas e método TUNEL, os quais não apresentaram valores com diferença estatística significativa entre estas duas soluções. Isto evidencia que, em relação às alterações teciduais pós-isquemia e reperfusão, formação de edema e apoptose celular, as duas soluções apresentam um desempenho semelhante.

7 Conclusão

Concluimos que, neste modelo de perfusão pulmonar ex-vivo, pulmões preservados com Perfadex® e Celsior® apresentaram desempenho similar em relação às trocas gasosas e parâmetros hemodinâmicos e de mecânica ventilatória. Os pulmões preservados com Perfadex® por 12 horas apresentaram mais edema. Os achados histopatológicos não diferiram entre os grupos estudados.

PROTOCOLO PARA REGISTRO DE DADOS

PROJETO: PERFADEX® x CELSIOR® x SALINA (6 e 12 horas)
LIM61-INCOR-USP

Data: ____/____/____

Experimento n°: ____

DOADOR:

Peso: ____ g

Tiopental: ____ mg/Kg

Sacrifício: ____ h, min

Heparina: ____ unidades

Ventilação:

VC: ____ ml/Kg peso

FR: ____ ciclos/min

Perfusão: [] Perfadex® [] Celsior® [] Salina

Temp. isq. fria: [] 6 horas [] 12 horas

PERFUSÃO EX-VIVO:

DADOS/ TEMPO	Max InsFl	Max ExpFl	TV	Pmax	Pmin	Cmpl	PAP	Peso
10 min								
20 min								
30 min								
40 min								
50 min								
60 min								

DADOS/ TEMPO	pH	pH	PaCO ₂	PaCO ₂	PO ₂	PO ₂	Hct	Htc	BE	BE	O ₂ Sat	O ₂ Sat
Amostra	art	ven	art	ven	art	ven	art	ven	art	ven	art	ven
10 min												
20 min												
30 min												
40 min												
50 min												
60 min												

Relação peso U/S

Peso úmido: ____ g

Peso seco: ____ g

Observações:

9 *Referências*

1. Jatene FB, Pêgo-Fernandes PM. Desafios do transplante pulmonar. *J Bras Pneumol*. 2008;34(5):249-50.
2. Pêgo-Fernandes PM, Medeiros IL, Mariani AW, Fernandes FG, Unterpertinger FDV, Samano MN, et al. Ex vivo lung perfusion: initial Brazilian experience. *J Bras Pneumol*. 2009;35(11):1107-11.
3. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th adult lung and heart-lung transplant report-2012. *J Heart Lung Transplant*. 2012;31(10):1073-86.
4. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Kern JA, Jones DR, et al. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg*. 2002;73(4):1041-7.
5. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):490-511.
6. King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, et al. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2000;69(6):1681-5.
7. Christie JD, Van Raemdonck D, de Perrot M, Barr M, Keshavjee S, Arcasoy S, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part I: introduction and methods. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(10):1451-3.
8. Fisher AJ, Donnelly SC, Hirani N, Haslett C, Strieter RM, Dark JH, Corris PA. Elevated levels of interleukin-8 in donor lungs is associated with early graft failure after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:259-65.
9. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation*. 1992;53(5):957-78.

10. Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(3):980-8.
11. Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med*. 2000;136(6):427-40.
12. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985;312(3):159-63.
13. Zhao G, Ayene IS, Fisher AB. Role of iron in ischemia-reperfusion oxidative injury of rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;16(3):293-9.
14. 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.
15. Quadri SM, Segall L, de Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, et al. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transplant*. 2005;5(2):292-9.
16. Yamazaki F, Yokomise H, Keshavjee SH, Miyoshi S, Cardoso PF, Slutsky AS, et al. The superiority of an extracellular fluid solution over Euro-Collins solution for pulmonary preservation. *Transplantation*. 1990;49(4):690-4.
17. Oka T, Puskas JD, Mayer E, Cardoso PF, Shi SQ, Wisser W, et al. Low-potassium UW solution for lung preservation. Comparison with regular UW, LPD, and Euro-Collins solutions. *Transplantation*. 1991;52(6):984-8.
18. Ueno T, Yokomise H, Oka T, Puskas J, Mayer E, Slutsky AS, et al. The effect of PGE1 and temperature on lung function following preservation. *Transplantation*. 1991;52(4):626-30.
19. DeCampos KN, Waddell TK, Slutsky AS, Post M, Patterson GA. Assessment of postpreservation rat lung function using a new model for extended venous reperfusion. *J Appl Physiol*. 1993;75(4):1890-6.

20. Baker CJ, Quardt SM, Kim JD, Darbinian SH, Starnes VA, Barr ML. A novel paracorporeal method for isolated rodent lung reperfusion. *Transplantation*. 2001;71(9):1244-8.
21. DeCampos KN, Waddell TK, Slutsky AS, Wang Y, Wang X, Post M, et al. Functional and biochemical assessment of postpreservation lung viability in a rat model. *J Appl Physiol*. 1994;76(2):813-20.
22. Pêgo-Fernandes PM, Werebe EDC, Cardoso PFG, Pazetti R, Oliveira KA, Soares PRO, et al. Experimental model of isolated lung perfusion in rats: technique and application in lung preservation studies. *J Bras Pneumol*. 2010;36(4):490-3.
23. DeCampos KN, Keshavjee SH, Tremblay L, Yamashiro T, Slutsky AS. Use of a hypoxic lung as a deoxygenator to provide extended assessment of pulmonary function in rats. *J Appl Physiol*. 1996;80(5):1835-40.
24. 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(12):1334-6.
25. Miyoshi S, Shimokawa S, Schreinemakers H, Date H, Weder W, Harper B, et al. Comparison of the University of Wisconsin preservation solution and other crystalloid perfusates in a 30-hour rabbit lung preservation model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992;103(1):27-32.
26. Keshavjee SH, Yamazaki F, Yokomise H, Cardoso PF, Mullen JB, Slutsky AS, et al. The role of dextran 40 and potassium in extended hypothermic lung preservation for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992;103(2):314-25.
27. 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(4):320-7.
28. 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 Dez;18(12):1198-201.
29. 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 Out;19(10):976-83.
30. Müller C, Hoffmann H, Bittmann I, Isselhard W, Messmer K, Dienemann H, et al. Hypothermic storage alone in lung preservation for transplantation: a metabolic, light microscopic, and functional analysis after 18 hours of preservation. *Transplantation*. 1997;63(5):625-30.
31. Connaughton PJ, Bahuth JJ, Lewis FJ. Lung ischemia up to six hours: influence of local cooling in situ on subsequent pulmonary function. *Dis Chest*. 1962;41:404-8.
32. Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA, Todd TR, Ginsberg RJ, Goldberg M, et al. Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1987;93(2):173-81.
33. Kirk AJ, Colquhoun IW, Dark JH. Lung preservation: a review of current practice and future directions. *Ann Thorac Surg*. 1993;56(4):990-1000.
34. White JJ, Tanser PH, Anthonisen NR, Wynands JE, Pare JA, Becklake MR, et al. Human lung homotransplantation. *Can Med Assoc J*. 1966;94(23):1199-209.
35. Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours ice storage. *Lancet*. 1969;2(7632):1219-22.
36. Sacks SA, Petritsch PH, Kaufman JJ. Canine kidney preservation using a new perfusate. *Lancet*. 1973;1(7811):1024-8.
37. Hakim M, Higenbottam T, Bethune D, Cory-Pearce R, English TA, Kneeshaw J, et al. Selection and procurement of combined heart and lung grafts for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1988;95(3):474-9.

-
38. 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(6):670-3.
 39. Locke TJ, Hooper TL, Flecknell PA, McGregor CG. Preservation of the lung. Comparison of topical cooling and cold crystalloid pulmonary perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988;96(5):789-95.
 40. Sarsam MA, Yonan NA, Deiraniya AK, Rahman AN. Retrograde pulmonary plegia for lung preservation in clinical transplantation: a new technique. *J Heart Lung Transplant.* 1993;12(3):494-8.
 41. Varela A, Montero C, Córdoba M, Serrano-Fiz S, Burgos R, Téllez JC, et al. Clinical experience with retrograde lung preservation. *Transpl Int.* 1996;9 Suppl 1:S296-8.
 42. Chen CZ, Gallagher RC, Ardery P, Dyckman W, Low HB. Retrograde versus antegrade flush in canine left lung preservation for six hours. *J Heart Lung Transplant.* 1996;15(4):395-403.
 43. Baretti R, Bitu-Moreno J, Beyersdorf F, Matheis G, Francischetti I, Kreitmayr B. Distribution of lung preservation solutions in parenchyma and airways: influence of atelectasis and route of delivery. *J Heart Lung Transplant.* 1995;14(11):80-91.
 44. Strüber M, Hohlfeld JM, Kofidis T, Warnecke G, Niedermeyer J, Sommer SP, et al. Surfactant function in lung transplantation after 24 hours of ischemia: advantage of retrograde flush perfusion for preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;123(1):98-103.
 45. Varela A, Montero CG, Córdoba M, Antequera A, Pérez M, Tabuenca MJ, et al. Improved distribution of pulmonary flush solution to the tracheobronchial wall in pulmonary transplantation. *Eur Surg Res.* 1997;29(1):1-4.
 46. Kohmann JC, Silva UL, Madke G, Pilla ES, Felicetti JC, Camargo JJP, Bittencourt PIH, Cardoso PFG. *Perfusão pulmonar anterógrada versus*

- retrógrada na preservação pulmonar para transplante em modelo canino de viabilidade pulmonar pós-morte. *J Bras Pneumol*. 1999;25(2):78-83.
47. Venuta F, Rendina EA, Bui M, Della Rocca G, De Giacomo T, Costa MG, et al. Preimplantation retrograde pneumoplegia in clinical lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999;118(1):107-14.
 48. Wang LS, Yoshikawa K, Miyoshi S, Nakamoto K, Hsieh CM, Yamazaki F, 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(3):333-42.
 49. Wang LS, Nakamoto K, Hsieh CM, Miyoshi S, Cooper JD. Influence of temperature of flushing solution on lung preservation. *Ann Thorac Surg*. 1993;55(3):711-5.
 50. Shiraishi T, Igisu H, Shirakusa T. Effects of pH and temperature on lung preservation: a study with an isolated rat lung reperfusion model. *Ann Thorac Surg*. 1994;57(3):639-43.
 51. de Perrot M, Bonser RS, Dark J, Kelly RF, McGiffin D, Menza R, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part III: donor-related risk factors and markers. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(10):1460-7.
 52. Haverich A, Aziz S, Scott WC, Jamieson SW, Shumway NE. Improved lung preservation using Euro-Collins solution for flush-perfusion. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1986;34(6):368-76.
 53. Steen S, Sjöberg T, Massa G, Ericsson L, Lindberg L. Safe pulmonary preservation for 12 hours with low-potassium-dextran solution. *Ann Thorac Surg*. 1993;55(2):434-40.
 54. 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(3):594-6.

-
55. Sasaki M, Muraoka R, Chiba Y, Hiramatu Y. Influence of pulmonary arterial pressure during flushing on lung preservation. *Transplantation*. 1996;61(1):22-7.
 56. Tanaka H, Chiba Y, Sasaki M, Matsukawa S, Muraoka R. Relationship between flushing pressure and nitric oxide production in preserved lungs. *Transplantation*. 1998;65(4):460-4.
 57. Kreisel D, Krupnick AS, Patterson GA. Lung Transplantation. In: Patterson GA, Cooper JD, Deslauriers J, Lerut AEMR, Luketich JD, Rice TW, editors. *Pearson's Thoracic & Esophageal Surgery*. 3a ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier. 2008. 1v, 660-90.
 58. Puskas JD, Hirai T, Christie N, Mayer E, Slutsky AS, Patterson GA. Reliable thirty-hour lung preservation by donor lung hyperinflation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992;104(4):1075-83.
 59. Haniuda M, Hasegawa S, Shiraishi T, Dresler CM, Cooper JD, Patterson GA. Effects of inflation volume during lung preservation on pulmonary capillary permeability. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996;112(1):85-93.
 60. DeCampos KN, Keshavjee S, Liu M, Slutsky AS. Optimal inflation volume for hypothermic preservation of rat lungs. *J Heart Lung Transplant*. 1998;17(6):599-607.
 61. Puskas JD, Cardoso PF, Mayer E, Shi S, Slutsky AS, Patterson GA. Equivalent eighteen-hour lung preservation with low-potassium dextran or Euro-Collins solution after prostaglandin E1 infusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992;104(1):83-9.
 62. de Perrot M, Fischer S, Liu M, Jin R, Bai XH, Waddell TK, et al. Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury: a shift from pro to anti-inflammatory cytokines. *Transplantation*. 2001;72(9):1505-12.
 63. Gohrbandt B, Sommer SP, Fischer S, Hohlfeld JM, Warnecke G, Haverich A, et al. Iloprost to improve surfactant function in porcine pulmonary grafts stored for twenty-four hours in low-potassium dextran solution. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;129(1):80-6.

-
64. Keshavjee SH, Yamazaki F, Cardoso PF, McRitchie DI, Patterson GA, Cooper JD. A method for safe twelve-hour pulmonary preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989;98(4):529-34.
 65. 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(3):480-91.
 66. 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(2):450-7.
 67. Müller C, Fürst H, Reichenspurner H, Briegel J, Groh J, Reichart B. Lung procurement by low-potassium dextran and the effect on preservation injury. Munich Lung Transplant Group. *Transplantation.* 1999;68(8):1139-43.
 68. 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(2):190-4.
 69. Torres RL, Beló-Klein A, Andrade CF, Cardoso PF. Effect of systemically administered low potassium dextran solution on oxidative stress in a rat model of lung ischemia. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2009;8(1):3-6.
 70. Torres RL, Martins LK, Picoral M, Auzani J, Fernandes TR, Torres IL, et al. The potential protective effect of low potassium dextran against lipid peroxidation in a rat lung transplantation model. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;57(5):309-11.
 71. Ingemansson R, Massa G, Pandita RK, Sjöberg T, Steen S. Perfadex is superior to Euro-Collins solution regarding 24-hour preservation of vascular function. *Ann Thorac Surg.* 1995;60(5):1210-4.
 72. Menasché P, Termignon JL, Pradier F, Grousset C, Mouas C, Alberici G, et al. Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1994;8(4):207-13.

-
73. Reigner J, Mazmanian M, Chapelier A, Alberici G, Ménasché 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(3):601-4.
 74. Barr ML, Nishanian GP, Sakamaki Y, Carey JN, Chang J, Starnes VA. A new organ preservation solution, Celsior, is superior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in decreasing lung reperfusion injury. *Transplant Proc*. 1997;29(1-2):1357-8.
 75. Wittwer T, Wahlers T, Cornelius JF, Elki S, Haverich A. Celsior solution for improvement of currently used clinical standards of lung preservation in an ex vivo rat model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;15(5):667-71.
 76. Fehrenbach A, Wittwer T, Cornelius J, Ochs M, Fehrenbach H, Wahlers T, et al. Improvement of rat lung structure and function after preservation with celsior. *J Surg Res*. 1999;82(2):285-93.
 77. Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, Sakamaki Y, Starnes VA, Barr ML. A comparison of the new preservation solution Celsior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury. *Transplantation*. 1999;67(1):152-5.
 78. D'armini AM, Grande AM, Rinaldi M, Goggi C, Vigano M. Prospective randomized clinical study of Celsior vs University of Wisconsin in double lung transplant. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20(2):183.
 79. 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 24 h of cold ischemia. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;26(1):151-7.
 80. Wittwer T, Franke UF, Fehrenbach A, Ochs M, Sandhaus T, Schuette A, et al. Experimental lung transplantation: impact of preservation solution and route of delivery. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(8):1081-90.
 81. Mühlfeld C, Müller K, Pallesen LP, Sandhaus T, Madershahian N, Richter J, et al. Impact of preservation solution on the extent of blood-air barrier damage

- and edema formation in experimental lung transplantation. *Anat Rec.* 2007;290(5):491-500.
82. Wu M, Yang Q, Yim AP, Underwood MJ, He GW. Cellular electrophysiologic and mechanical evidence of superior vascular protection in pulmonary microcirculation by Perfadex compared with Celsior. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;137(2):492-8.
83. Pizanis N, Gillner S, Kamler M, de Groot H, Jakob H, Rauen U. Cold-induced injury to lung epithelial cells can be inhibited by iron chelators – implications for lung preservation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011;40(4):948-55.
84. 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(5):853-9.
85. 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(6):2191-4.
86. Cypel M, Sato M, Yildirim E, Karolak W, Chen F, Yeung J, et al. Initial experience with lung donation after cardiocirculatory death in Canada. *J Heart Lung Transplant.* 2009;28(8):753-8.
87. Wittwer T, Wahlers T, Fehrenbach A, Cornelius JF, Elki S, Ochs M, et al. Combined use of prostacyclin and higher perfusate temperatures further enhances the superior lung preservation by Celsior solution in the isolated rat lung. *J Heart Lung Transplant.* 1999;18(7):684-92.
88. Puskas JD, Oka T, Mayer E, Wisser W, Downey GP, Slutsky AS, et al. Hemodilution reduces early reperfusion injury in an ex vivo rabbit lung preservation model. *Ann Thorac Surg.* 1994;57(3):731-5.
89. Ankier SI, West GB, Harris JM, Luscombe DK. Reactivity of Wistar rats to dextran. *J Pharm Pharmacol.* 1965;17:118-9.
90. Ankier SI, West GB. Inhibition of the anaphylactoid reaction in rats. *Br J Pharmacol Chemother.* 1968;33(2):304-11.

-
91. Koller ME, Berg A, Rodt SA, Westerberg E, Reed RK. alpha-Trinositol prevents increased negativity of interstitial fluid pressure in rat skin and trachea induced by dextran anaphylaxis. *Eur J Pharmacol.* 1997;331(2-3):259-66.
 92. Woie K, Koller ME, Heyeraas KJ, Reed RK. Neurogenic inflammation in rat trachea is accompanied by increased negativity of interstitial fluid pressure. *Circ Res.* 1993;73(5):839-45.
 93. Blazsó G, Koltai M, Ottlecz A, Minker E. Dextran anaphylactoid reaction in Sprague-Dawley CFY rats. *Acta Physiol Acad Sci Hung.* 1979;54(3):281-6.
 94. Koltai M, Blazsó G, Ottlecz A, Minker E. Some characteristics of the insulin-induced potentiation to anaphylactoid reaction in Sprague-Dawley rats. *Acta Physiol Acad Sci Hung.* 1979;54(3):287-93.
 95. Hanusch C, Nowak K, Törlitz P, Gill IS, Song H, Rafat N, et al. Donor dopamine treatment limits pulmonary oedema and inflammation in lung allografts subjected to prolonged hypothermia. *Transplantation.* 2008;85(10):1449-55.
 96. Zhou H, Fu Z, Wei Y, Liu J, Cui X, Yang W, et al. Hydrogen inhalation decreases lung graft injury in brain-dead donor rats. *J Heart Lung Transplant.* 2013;32(2):251-8.
 97. Hanusch C, Hauser C, Geisler A, Nowak K, Dacho A, van Ackern K, et al. Reduction of oedema formation after preconditioning with dopamine in an isolated rat lung model is mediated by adrenergic receptors. *Ann Transplant.* 2011;16(3):97-107.
 98. Avlonitis VS, Wigfield CH, Kirby JA, Dark JH. Treatment of the brain-dead lung donor with aprotinin and nitric oxide. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29(10):1177-84.