Lucas Matos Fernandes

Comparação entre duas soluções de recondicionamento pulmonar em pulmões humanos não-aceitos para transplante em modelo de avaliação e recondicionamento pulmonar *ex vivo*

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular
Orientador: Prof. Dr. Paulo Manuel Pego Fernandes

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Fernandes, Lucas Matos
Comparação entre duas soluções de recondicionamento pulmonar em pulmões humanos não-aceitos para transplante em modelo de avaliação recondicionamento pulmonar *ex-vivo* / Lucas Matos Fernandes. -- São Paulo, 2015.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Paulo Manuel Pego Fernandes.

Descritores: 1.Transplante de pulmão 2.Preservação de órgãos 3.Lesão pulmonar aguda 4.Estudo comparativo

USP/FM/DBD-126/15

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Hermínio e Jô, pela paciência, inspiração, educação, paixão e tantos outros substantivos.

Às minhas irmãs, Loraine e Lizieux, pelo pela amizade.

À Arielle, minha companheira e confidente.

A minha família, Vô Eugênio (*in memorian)*, Vó Cezira, tios e tias, além de todos os primos.

Agradeço a turma do transplante: Samano, Gustavo, Silvia, Ricardo, José Eduardo, Rafael, Priscila, Nathan, Soninha e Liliane pelos dias de luta e de paz.

Ao meu orientador, Professor Paulo Manuel Pêgo Fernandes, por acreditar que um dia a tese iria sair.

Às meninas do LIM, Natalia, Karina e Lili, por toda ajuda em manter o laboratório em ordem e na execução da histologia.

Ao Rogério Pazetti e Ari Correia por ajudarem a transformar a tese em palavras e estatística.

Aos grandes amigos João Victor e Maurício pelos bons e maus momentos de toda a vida.

Aos demais assistentes da Cirurgia Torácica: Hélio Minamoto, Luis Melero, Ricardo Beyrute, Ricardo Terra, Pedro Nabuco, Letícia Lauricella, Benoit Bibas, Alberto Jorge, José Ribas, Miguel Tedde, Paulo Cardoso e Ângelo Fernandes pelos ensinamentos.

Aos amigos de longe que sempre estão perto, Meibal, Marcy, Thiago Franchi, Thiago Alonso, Álvaro, Fernando “Burns” Olibone, Fábio Barbosa, Tio Raul, Tia Ana, Rodolfo, Fernando Pajanoti, Renato Pontelli, João Manuel, Vânia, Guilherme...

À Roseli, Márcia e Eliana pela assistência e presteza e às meninas da pós-graduação, em especial a Neusa e Juliana por toda a paciência.

À Secretaria de Saúde e Central Estadual de Transplante, junto com as famílias dos doadores de órgãos, que, durante um momento de tristeza, encontram forças para ajudar outros a seguir em frente por meio do transplante e pesquisa.

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. Divisão 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 Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

1. INTRODUÇÃO.....1

2. OBJETIVOS.....4

3. REVISÃO DE LITERATURA.....5

3.1 Preservação pulmonar.....6

3.2 Soluções de perfusão.....7

3.3 Vias de perfusão.....10

3.4 Volume de solução de preservação.....11

3.5 Pressão da perfusão da solução de preservação.....12

3.6 Temperatura da solução de preservação e armazenamento.....13

3.7 Ventilação e insuflação pulmonar durante o armazenamento.....14

3.8 Perfusão pulmonar *ex vivo*.....15

3.8.1 Solução de recondicionamento e normotermia.....17

3.8.2 Vantagens do recondicionamento pulmonar *ex vivo*.....19

4. MATERIAL E MÉTODOS.....20

4.1 Desenho experimental.....20

4.2 Perfusão pulmonar.....22

4.3 Extração pulmonar.....23

4.4 Técnica de recondicionamento pulmonar *ex vivo*.....24

4.5 Variáveis de estudo.....29

4.5.1 Avaliação do edema pulmonar.....29

4.5.2 Função pulmonar.....29

4.5.3 Avaliação histológica.....30

4.5.3.1 Microscopia óptica.....30

4.5.3.2 Avaliação de apoptose.....31

4.5.4 Análise estatística.....34
5. RESULTADOS.....36
5.1 Avaliação do edema pulmonar.....37
5.2 Avaliação funcional.....39
5.3 Avaliação hemodinâmica.....41
5.4 Mecânica ventilatória.....42
5.5 Pressão das vias aéreas.....43
5.6 Análise histológica.....44
5.7 Apoptose.....45

6. DISCUSSÃO.....46

7. CONCLUSÃO.....53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. **Desenho experimental.....22**

Figura 2. **Caixa para suporte do bloco pulmonar (XVIVO© Chamber) no sistema de perfusão pulmonar *ex vivo*.....25**

Figura 3. **Sistema de pefusão pulmonar *ex vivo*.....26**

Figura 4. **Detalhe da canulação do bloco pulmonar.....27**

Figura 5. **Detalhe da cânula da artéria pulmonar.....28**

Figura 6. **Microscopia de fluorescência Axioskop 2 com câmera filmadora e monitor usados para a contagem de células apoptóticas.....34**

Figura 7. **Representação da técnica de identificação de células apoptóticas usando o programa de análise de imagem AxionVision a partir de imagens captadas pelo microscópio de fluorescência em aumento de 400x.....35**

Lista de Tabelas

Tabela 1. **Composição das principais soluções de preservação de órgãos.....10**

Tabela 2. **Composição da solução de produção nacional.....19**

Tabela 3. **Estratégia para execução da perfusão pulmonar *ex vivo*.....29**

Tabela 4. **Variáveis analisadas na escala de avaliação histológica.....32**

Tabela 5. **Homogeneidade dos grupos: características clínicas e demográficas.....38**

Lista de Gráficos

Gráfico 1. **Avaliação dos pesos ao longo do tempo.....39**

Gráfico 2. **Relação entre o peso úmido e o peso seco dos pulmões esquerdos avaliados após o recondicionamento.....40**

Gráfico 3. **PaO_2 dos blocos pulmonares no momento da captação (PRÉ ISQ) e após 60 minutos de recondicionamento (PÓS REP).....41**

Gráfico 4. **Capacidade Relativa de Oxigenação (ROC) dos blocos pulmonares dos grupos STEEN e SRNac após o recondicionamento.....41**

Gráfico 5. **Resistência vascular pulmonar dos dos blocos pulmonares dos grupos STEEN e SRNac após o recondicionamento.....42**

Gráfico 6. **Complacência pulmonar medida dos grupos STEEN e SRNac após o recondicionamento.....43**

Gráfico 7. **Pressão das vias aéreas medida nos grupos STEEN e SRNac após o recondicionamento.....44**

Gráfico 8. **Escore de lesão pulmonar.....45**

Gráfico 9. **Células apoptóticas.....46**

Lista de Abreviaturas

ELP Escore de lesão pulmonar

FiO_2 Fração inspirada de oxigênio

InCor – HC/FMUSP Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo

ISHLT *Internacional Society for Heart and Lung Transplantation*

PaO_2 Pressão parcial de oxigênio arterial

$PaCO_2$ Pressão parcial de gás carbônico arterial

PAP Pressão da artéria pulmonar

PGD *Primary Graft Disfunction* (Disfunção primária do enxerto)

PvO_2 Pressão parcial de oxigênio venosa

LPD-G *Low Potassium Dextran-Glucose* (solução de dextran-glicose e baixo teor de potássio)

PEEP *Positive End Expiratory Pressure* (pressão positiva expiratória final)

RVP Resistência vascular pulmonar

SBO Síndrome da Bronquiolite Obliterante

SPOT Serviço de Procura de Órgãos e Tecidos

VCI Veia cava inferior

VCS Veia cava superior

Lista de Símbolos

cel Célula

cm Centímetro

cmH_2O Centímetros de água

g Grama

°C Graus Celsius
h Hora

mL Mililitro

kg Kilograma

® Marca Registrada

mmHg Milímetros de mercúrio

µ Micro

m^2 Metro quadrado

mm^2 Milímetro quadrado

mmol Milimol

min minuto

s segundo

UI Unidade

Fernandes LM. *Comparação entre duas soluções de recondicionamento pulmonar em pulmões humanos não-aceitos para transplante em modelo de avaliação e recondicionamento pulmonar ex vivo* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: O transplante pulmonar é terapia reconhecida de tratamento de doenças terminais pulmonares. Os pulmões, entretanto, são muito susceptíveis às transformações hormonais e hidroeletrolíticas ocorridas no doador após a morte encefálica. As baixas taxas de aproveitamento dos pulmões alavancam pesquisas e meios de utilizar pulmões considerados não-ideais. Um desses modelos é o recondicionamento pulmonar *ex-vivo* concebido por Steen, no qual se utiliza uma solução hiperosmolar (Steen Solution®) para avaliação e melhora dos pulmões doados. Consideramos que o desenvolvimento de uma solução de recondicionamento pulmonar produzida no Brasil seria conveniente aos serviços de transplante e aos pacientes. Foram comparadas a solução de recondicionamento Steen Solution® e uma solução de fabricação nacional em modelo de *ex vivo* de pulmões humanos não aceitos para transplante, através da avaliação da mecânica ventilatória, hemodinâmica, trocas gasosas e histologia. MÉTODOS: Foram utilizados 16 pulmões de doadores em morte encefálica, considerados inadequados para o transplante pulmonar. Os pulmões foram submetidos à captação habitual e acondicionados sob isquemia fria por 10 horas. Após este período, os pulmões foram designados, por sorteio, para reperfusão com a solução padrão (Steen solution®) ou a solução nacional por 1h em modelo *ex vivo*. A lesão pulmonar foi estudada através de parâmetros gasométricos, resistência pulmonar e complacência pulmonar. Foram medidos os pesos em três tempos e relação peso úmido/peso seco após a reperfusão para avaliação de edema. A partir de biópsias seriadas era calculado um *score* de lesão tecidual e grau de apoptose. RESULTADOS: A capacidade de oxigenação foi de 498,00 ± 37,53 mmHg no grupo STEEN e 521,00 ± 55,43 mmHg no grupo SRNac (p = 0,348). A capacidade relativa de oxigenação calculada ao final do recondicionamento foi 501,37 ± 207,77 no grupo STEEN e 470,30 ± 232,41 no grupo SRNac (p=0,782). Os pesos dos pulmões nos três momentos de avaliação foram: início da isquemia: STEEN = 1.026 ± 451 g, SRNac = 745 ± 282 g (p = 0,180); fim da isquemia: STEEN = 998 ± 391 g, SRNac = 738 ± 316 g (p = 0,184); e fim da reperfusão: STEEN = 1.097 ± 526 g, SRNac = 743 ± 248 g (p = 0,163). A relação peso úmido/peso seco foi 3,63 ± 1,26 no grupo SRNac e 2,06 ± 0,28 no grupo STEEN (p = 0,009). A resistência vascular pulmonar foi 787,99 ± 367,23 dina.s.cm^{-5} no grupo STEEN e 1.026,81 ± 1.112,53 dina.s.cm^{-5} no grupo SRNac (p = 0,575). A complacência pulmonar média foi 46,75 ± 20,99 mL/cmH_2O no grupo STEEN e 49,74 ± 26,11 cmH_2O no grupo SRNac (p = 0,809). O Escore de Lesão Pulmonar foi: STEEN = 4,38 ± 1,51 e SRNac = 4,50 ± 1,77 (p = 0,881). O número de células apoptóticas foi: STEEN = 2,4 ± 2,0 cel/mm^2 e SRNac = 4,8 ± 6,9 cel/mm^2 (p = 0,361). CONCLUSÕES: Os pulmões reperfundidos com a solução de recondicionamento de fabricação nacional apresentaram características morfológicas e funcionais similares aos que foram reperfundidos com a solução STEEN®, apesar do maior edema encontrado no grupo da solução nacional.

Descritores: transplante de pulmão; preservação de órgãos; lesão pulmonar aguda; estudo comparativo.

Fernandes LM. *Comparison between two pulmonary reconditioning solution in human lungs non-accepted for transplantation with an ex vivo lung assessment and reconditioning model* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

INTRODUCTION: Lung transplantation is routine treatment of end-stage lung diseases. The lungs, however, are very susceptible to hormonal and electrolyte changes occurred in the donor after brain death. The low recovery rates of the lungs leverage researches and ways to use lungs considered non-ideal. One such model is the lung ex vivo reconditioning designed by Steen, in which using a hyperosmolar solution (Steen Solution®) for evaluation and improvement of donor lungs. We believe that the development of a pulmonary reconditioning solution produced in Brazil would be convenient to transplantation service and patients. Were compared the standard Steen Solution® and a national manufacturing solution in *ex vivo* model with human lungs not accepted for transplant, through the evaluation of respiratory mechanics, hemodynamics, gas exchange and histology. METHODS: 16 brain-dead donors lungs, considered unsuitable for lung transplantation, were used. The lungs were harvest as usual, packed and stored in cold ischemia for 10 hours. After this period, the lungs were appointed by randomization to reperfusion with the standard solution (Steen Solution®) or national solution for 1 h in *ex vivo* model. Lung injury was accessed by blood gas parameters, lung resistance and lung compliance. The weights were measured in three times and the after reperfusion wet weight / dry weight ratio for evaluation of edema. The degree of apoptosis and tissue injury score was calculated from serial biopsies. RESULTS: The oxygenation capacity was 498.00 ± 37.53mmHg in STEEN group and 521.00 ± 55.43mmHg in SRNac group (p = 0.348). The relative oxygenation capacity calculated at the end of the reconditioning was 501.37 ± 207.77 in the STEEN group and 470.30 ± 232.41 in the SRNac group (p = 0.782). The weights of lungs in the three stages of evaluation were: onset of ischemia: STEEN = 1,026 ± 451g, SRNac = 745 ± 282g (p = 0.180); end of ischemia: STEEN = 998 ± 391g, SRNac = 738 ± 316g (p = 0.184); and the end of reperfusion: STEEN = 1,097 ± 526g, SRNac = 743 ± 248g (p = 0.163). The wet weight / dry weight ratio was 3.63 ± 1.26 in SRNac group and 2.06 ± 0.28 in STEEN group (p = 0.009). Pulmonary vascular resistance was 787.99 ± 367.23dina.s.cm^{-5} in STEEN group and 1026.81 ± 1112.53dina.s.cm^{-5} in SRNac group (p = 0.575). The Lung Injury Score was: STEEN = 4.38 ± 1.51 and SRNac = 4.50 ± 1.77 (p = 0.881). The number of apoptotic cells was: STEEN = 2.4 ± 2.0 cells / mm 2 and SRNac = 4.8 ± 6.9 cells / mm2 (p = 0.361). CONCLUSIONS: The lungs reperfused with national manufacturing reconditioning solution presented morphological and functional characteristics

similar to those reperfused with STEEN® solution despite the greater edema found in the group of national solution.

Descriptors: lung transplantation; organ preservation; acute lung injury; comparative study.

1. Introdução

Os avanços nos transplantes de órgãos sólidos têm acrescentado grande conhecimento à área terapêutica das doenças avançadas e falhas orgânicas. Em relação ao transplante pulmonar, pouco se havia caminhado até a década de 80 do século passado, antes do surgimento da ciclosporina. Hoje, o transplante pulmonar é uma opção bem estabelecida no arsenal médico para o tratamento das doenças pulmonares terminais e com expectativa de vida limitada.

Apesar do aumento progressivo dessa terapêutica, atingindo mais de 3.500 transplantes por ano no Registro da *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) em 2012[1], o transplante pulmonar ainda não consegue atender a todos os pacientes selecionados para essa modalidade de tratamento. Conseqüentemente, a mortalidade em lista de espera por um órgão permanece alta, tanto pelo aumento da gravidade dos casos como pelo baixo aproveitamento dos pulmões[2], se comparado a outros órgãos sólidos como rim e fígado[3,4].

Algumas soluções para esse problema têm sido propostas, como campanhas para o aumento da oferta de órgãos, capacitação de equipes para o adequado cuidado dos doadores, uso de órgãos com critérios de aceitação estendidos (não-ideais)[5], uso de pulmões de doadores com o coração parado e, mais recentemente, recondicionamento de pulmões[6] com sua função prejudicada pelo processo inflamatório decorrente da morte encefálica ou pelos excessos realizados durante os cuidados intensivos do doador.

O recondicionamento pulmonar teve sua origem na Suécia, na Universidade de Lund, onde o professor Stig Steen utilizou pela primeira vez um sistema de perfusão extracorpórea e uma solução específica (*Steen Solution*®) para avaliar em normotermia e em pleno funcionamento pulmões de um potencial doador que estava com o coração parado[7]. O sucesso desse caso levou diversos grupos de transplantes de todo o mundo a produzirem estudos nessa área, que ficou conhecida por "perfusão pulmonar *ex vivo"*. Os estudos mostraram que esse método permitia não só que os pulmões fossem avaliados de forma mais criteriosa, como também poderiam ter sua função otimizada, uma vez que a solução utilizada apresenta alta osmolaridade e ajuda a diminuir o edema pulmonar[8].

O grupo de Toronto, liderado pelo Dr. Shaf Keshavjee, tem a maior casuística de órgãos recondicionados até 2012[9], com 58 pulmões testados, dos quais 50 foram transplantados. Além disso, esse grupo foi o que trouxe as maiores contribuições para o desenvolvimento de técnicas de recuperação dos pulmões não aproveitados, a princípio, para o transplante. Com algumas modificações na técnica, como utilização da solução de recondicionamento sem uso de concentrado de hemácias e a canulação do átrio esquerdo para que se mantenha uma pressão positiva atrial e mais próxima do fisiológico, diminuindo a formação de edema após um tempo mais prolongado de perfusão[10], esse e alguns outros grupos têm se dedicado à investigação da normotermia para a melhora dos pulmões a partir de engenharia genética[11–13] e substâncias anti-inflamatórias[14,15].

No Brasil, o Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HC/FMUSP) teve sua

experiência em recondicionamento pulmonar iniciada em 2008, com a ida de membros da equipe de Transplante Pulmonar até a Suécia para aprender a técnica. Inicialmente, um modelo experimental com pulmões humanos não aceitos para transplante foi testado mediante aprovação da comissão de ética[16], enquanto era aguardada a liberação para uso clínico.

Existe uma grande motivação para o estudo de novas soluções que está no fato de as principais soluções utilizadas no transplante pulmonar serem importadas. Apesar de amplamente disponíveis no mercado mundial, as soluções Perfadex ® e Steen Solution® podem estar mais ou menos acessíveis para compra no Brasil a depender de oscilações da balança comercial e do valor do dólar, do preço elevado dessas soluções e das dificuldades logísticas geradas pela importação, tanto direta quanto por intermediários. De fato, ainda é possível se deparar com atrasos burocráticos do sistema aduaneiro de portos e aeroportos nacionais de materiais médico-hospitalares de alto custo, o que já levou, inclusive, à interrupção do programa de transplante pulmonar do InCor-HC/FMUSP, em um passado recente, por falta de solução de preservação pulmonar (Perfadex®).

Assim sendo, consideramos que o desenvolvimento de uma solução de recondicionamento pulmonar inteiramente produzida no Brasil, com características equivalentes, ou mesmo superiores, às da solução importada comercializada atualmente, seria muito conveniente aos serviços de transplante, aos cofres públicos e, conseqüentemente, aos pacientes que necessitam do transplante pulmonar.

2. Objetivos

Geral: Comparar, através de avaliação da mecânica ventilatória, hemodinâmica, trocas gasosas, histologia e apoptose, a solução padrão de recondicionamento Steen Solution® e a solução de fabricação nacional em modelo de avaliação *ex vivo* de pulmões humanos não aceitos para transplante.

3. Revisão da literatura

O transplante de pulmão se tornou, nas últimas duas décadas, a terapia de escolha para doenças terminais pulmonares. Desde 1983, quando o transplante pulmonar foi realizado com sucesso pelo grupo de Toronto[17], mais de 40 mil transplantes já foram realizados no mundo, conforme o último Registro da ISHLT[1]. Não somente o número de transplantes aumentou de maneira importante, sendo mais de 3.500 em 2010, como também a sobrevida dos pacientes transplantados, que passou de 4,2 anos[18], em média, para 5,5 anos[1].

Apesar de ser o único órgão com capacidade de manter metabolismo aeróbico mesmo após a interrupção da circulação sanguínea, quando comparado a outros órgãos sólidos, o pulmão possui uma susceptibilidade maior a infecções, congestão e tempo de isquemia. Essa fragilidade faz do pulmão um órgão de difícil aproveitamento para o transplante. Em 2006, a taxa de utilização do órgão no estado de São Paulo foi de 4,9%[19], muito menor que em outros países onde o aproveitamento do órgão pode chegar a 39%[2], ou de outros órgãos sólidos como rins, com índices maiores que 90%[4], e fígado, mais de 80%[3].

As principais razões para a recusa de pulmões para transplante são os altos índices de infecção pulmonar e as trocas gasosas deficientes, refletidas pela baixa relação entre a pressão parcial de oxigênio e a fração inspirada de oxigênio (PaO_2/FiO_2)[19]. Esse parâmetro parece ser fortemente afetado pela somatória de efeitos metabólicos desencadeados pelo estado de morte

encefálica. Além disso, a pressão exercida pelas equipes de captação de outros órgãos, como rins e fígado, faz com que haja pouca restrição à infusão de soluções cristalóides no doador, o que aumenta a chance de edema pulmonar com conseqüente piora da relação PaO_2/FiO_2. Devido à baixa taxa de aproveitamento de pulmões para transplante em nosso meio, a mortalidade dos pacientes já incluídos na fila de espera chega a 18.9%[20].

As principais causas de morbi-mortalidade dos transplantados são as infecções e a disfunção primária do enxerto (*Primary Graft Disfuction* - PGD), envolvidos no processo de falência dos pulmões a curto e longo prazo (síndrome da bronquiolite obliterante, SBO)[1,18]. A PGD, definida por edema pulmonar não cardiogênico e hipoxemia, tem uma incidência entre 11% e 57% em diferentes centros[21,22] e é responsável por cerca de 30% da mortalidade pós-operatória[22–24]. Fatores como idade do doador, história de tabagismo[25], preservação do pulmão[26] e hipertensão pulmonar primária[27] estão envolvidos com o desenvolvimento da PGD.

3.1 Preservação pulmonar

Devido à necessidade de aumentar o número de pulmões viáveis para o transplante, diferentes técnicas de preservação pulmonar foram desenvolvidas e, ao longo dos anos, modificadas. Entretanto, as bases da preservação do pulmão são as mesmas de outros órgãos: perfusão com uma solução de preservação e resfriamento (4°C). No caso dos pulmões, isso é conseguido pela perfusão da solução resfriada pela artéria pulmonar juntamente com o

resfriamento externo dos pulmões inundando-se a cavidade torácica com a mesma solução resfriada.

A perfusão anterógrada[28] é a via preferencial de administração das soluções de preservação, devido ao fácil acesso e simplicidade técnica. No entanto, o uso adicional da perfusão retrógrada, isto é, a partir das veias pulmonares, promove a retirada de pequenos trombos dos capilares e uma melhor distribuição do fluxo da solução. Cabe ressaltar a importância da manutenção da ventilação pulmonar durante a captação para a obtenção de uma perfusão uniforme.

3.2 Soluções de perfusão

Diferentes tipos de solução de preservação foram desenvolvidos e usados na prática médica na tentativa de melhorar os resultados e diminuir a PGD. Contudo, a eficácia clínica relativa dessas soluções em prevenir a PGD permanece controversa[29–31].

Os líquidos de preservação de órgãos podem ser divididos em: predominantemente intracelulares, com alto teor de potássio e baixo teor de sódio, como a solução Euro-Collins® e a solução da Universidade de Wisconsin®; e predominantemente extracelulares, com baixo teor de potássio e alto teor de sódio, como as soluções Celsior® e Perfadex® (também conhecida como LPD-G, do inglês *low potassium dextran glucose*).

Dessas soluções, apenas o Perfadex® foi originalmente desenvolvido com o propósito de servir para a preservação dos pulmões. Porém, as demais soluções também são, ou já foram, utilizadas na proteção pulmonar. A solução

da Universidade de Wisconsin® foi criada para a preservação do fígado e do pâncreas[32]; a solução de Euro-Collins para a preservação dos rins[33]; e a Celsior para o coração[34]. A composição dessas soluções pode ser observada na Tabela 1.

As soluções intracelulares, Euro-Collins® e da Universidade de Winsconsin®, são ricas em potássio e têm como objetivo evitar a formação de edema celular no órgão preservado, através do equilíbrio iônico do ambiente extracelular, uma vez que, durante a isquemia fria, a bomba de sódio-potássio-ATPase encontra-se inativa. O aumento do potássio extracelular evita o movimento natural do sódio para fora da célula e o movimento de água para o meio intracelular. Ainda na linha de se evitar o edema celular, as soluções de preservação, tanto intra quanto extracelulares, também contam com a presença de substâncias de alto peso molecular (geralmente açúcares) que não são permeáveis à membrana celular, aumentando a pressão coloidosmótica do ambiente extracelular[35].

Um problema do uso de soluções de preservação intracelulares é que o alto teor de potássio favorece a vasoconstrição do leito capilar pulmonar e a possibilidade de parada cardíaca por hipercalemia durante a reperfusão. Por isso, as soluções extracelulares têm sido amplamente aplicadas. Um exemplo é o Perfadex® que, além da baixa concentração de potássio, utiliza o dextran 40 como componente osmótico, e tem propriedades de deformação das hemácias, prevenindo a agregação dos eritrócitos, incluindo a dissolução dos já agregados, melhorando a microcirculação pulmonar e preservando a barreira alvéolo-capilar[36].

Tabela 1 – Composição das principais soluções de preservação de órgãos

Componente	Euro-Collins®	University of Wisconsin®	Celsior®	Perfadex ®
Na^+	10	28	100	138
K^+	108	125	15	6
Cl^-	14	-	41,5	142
Mg^{+2}	-	-	13	0,8
Ca^{+2}	-	-	0,25	0,3
Glicose	35	-	-	5
Rafinose	-	30	-	-
Lactobionato	-	100	80	-
Dextran 40	-	-	-	50
Manitol	-	-	60	-
SO^{-2}	8	4	-	0,8
PO_4^{-3}	93	25	-	0,8
HCO_3^-	8	5	-	1
Histidina	-	-	30	-
Trometanol	-	-	-	1
Adenosina	-	1	-	-
Glutamato	-	-	20	-
Alopurinol	-	1	-	-
Glutationa	-	3	3	-
Insulina	-	100	-	-
Metilprednisolona	-	8	-	-
Osmolaridade	452	327	320	335

Nota: As concentrações estão expressas em mmol/L, com exceção: da glicose e do dextran 40, expressos em g/L; da insulina, expressa em U/L; da metilprednisolona, expressa em mg/L; e da osmolaridade, expressa em mOsm/L.

O conceito do uso de uma solução extracelular para a preservação dos pulmões foi desenvolvido no final dos anos 80. Fujimura e colaboradores, utilizando a solução de Euro-Collins® como base, demonstraram que uma

solução extracelular modificada era superior à intracelular para preservação pulmonar prolongada[37]. Acompanhando os testes iniciais, outros trabalhos demonstraram que as soluções extracelulares melhoram a função pulmonar e diminuem a PGD quando comparadas às intracelulares[31,38–48].

No entanto, poucas comparações estão publicadas entre as soluções extracelulares. O grupo de Hannover publicou 2 trabalhos apresentando superioridade da solução Celsior® sobre a LPD-G em modelo animal. Contudo, as diferenças foram pequenas ou com tempo de isquemia maior que o tradicionalmente utilizado[30,49]. Já Wittwer aponta o uso do Perfadex® como suficiente para tempos de isquemia prolongados e considera a Celsior® como não adequada para tempos mais extensos[50].

Hoje em dia, existe uma clara preferência ao uso de soluções extracelulares para preservação pulmonar.

3.3 Via de perfusão

Como já apontado anteriormente, a rota preferencial de administração da solução de preservação é a artéria pulmonar. Contudo, desde meados dos anos 90, tem-se estudado a rota contrária, isto é, a perfusão retrógrada, a partir de uma abertura no átrio esquerdo ou pelas veias pulmonares. O fluxo retrógrado possui algumas particularidades que parecem torná-lo muito atrativo em relação à via convencional, anterógrada. A perfusão retrógrada promove a retirada de microêmbolos (coágulos e gorduras) dos leitos capilares, formados apesar do uso da heparina, perfusão da vascularização brônquica (não irrigada

pela artéria pulmonar) e a limitação do efeito da vasoconstrição da trama vascular pulmonar[28].

Estudos experimentais já associaram a rota retrógrada com melhor função e histologia do enxerto quando comparada com a via anterógrada[51] e menor resistência vascular pulmonar em doadores com o coração parado[52]. Venuta e colaboradores, em ensaio clínico randomizado, sugerem o uso da via anterógrada e retrógrada combinadas para a perfusão pulmonar[53]. Apesar de a via anterógrada continuar sendo a via preferencial durante a captação pulmonar (principalmente por sua facilidade técnica), muitos centros adotaram em sua prática uma nova perfusão por via retrógrada durante o preparo do bloco pulmonar pré-implante, com o objetivo de perfundir a árvore brônquica, retirar possíveis êmbolos e elementos figurados do sangue para reduzir a produção de radicais livres pelo mecanismo das xantinas[54,55]. O grupo de Toronto advoga uma perfusão inicial com a solução de LPD-glicose anterógrada com 50-60 mL/kg de solução e uma retrógrada com 250 mL por veia pulmonar antes do implante[36]. Um estudo retrospectivo com 153 pacientes transplantados de pulmão reportou que a perfusão tardia por via retrógrada não acrescenta nada aos resultados da rota tradicional anterógrada exclusiva, contudo, sugerem o uso da perfusão retrógrada ainda com os pulmões no doador em ventilação, após a perfusão inicial pela artéria pulmonar[56].

3.4 Volume de solução de preservação

A quantidade de solução utilizada para preservação pulmonar vem sendo analisada desde os anos 80. Baixos volumes de solução, como 20

mL/kg, não atingem o necessário para uma boa perfusão. Com estes volumes, associados ao baixo fluxo, os pulmões não são perfundidos de maneira uniforme. As regiões pulmonares dependentes da gravidade recebem a maior parte da solução, enquanto segmentos ventrais são pouco perfundidos e apresentam deterioração mais precoce com perda importante da função. A maioria dos grupos de transplante usa de 50 a 75 mL/kg, volume suficiente para uma perfusão uniforme e resfriamento do órgão. Contudo, Steen e colaboradores sugerem o uso de 150 a 180 mL/kg de Perfadex® para obter uma limpeza mais clara das regiões anteriores[57].

3.5 Pressão de perfusão da solução de preservação

A perfusão da solução de preservação pela artéria pulmonar no momento da coleta não deve ser realizada com pressões muito elevadas. O tema foi analisado por Sasaki e colaboradores que, utilizando coelhos, demonstraram que perfusão com pressão da solução de 5, 20 e 25 mmHg não foi capaz de uma perfusão clara e uniforme do leito vascular pulmonar, resultando em hipofunção e edema pulmonar pós-reperfusão. Contudo, com pressões de perfusão de 10 e 15 mmHg (13,6 e 20,4 cmH_2O) se obteve boa perfusão do leito pulmonar e manutenção de função pulmonar adequada[58]. Seguindo essa linha de pesquisa, Tanaka e associados observaram que pressões de perfusão menores que 20 mmHg são necessárias para que se mantenha a habilidade de produção de óxido nítrico endógeno nos pulmões preservados[59]. Os melhores resultados com pressões mais baixas da solução também foram encontrados por Schumann e colaboradores em modelos

suínos, quando os pulmões perfundidos com soluções posicionadas a 65 cm de altura em relação aos pulmões apresentaram menos edema e melhor função da mecânica pulmonar que os pulmões perfundidos com soluções a 105 cm de altura[60]. Ainda não há ensaios clínicos que confirmem os experimentos, mas baixas pressões de infusão da solução de perfusão têm sido utilizadas na prática clínica.

3.6 Temperatura da solução de preservação e de armazenamento

A hipotermia permanece como meio fundamental para a preservação pulmonar. Entretanto, baixas temperaturas interferem em várias atividades celulares, como a produção de surfactante pelos pneumócitos tipo II e causam lesões ao endotélio. Os efeitos negativos do resfriamento, no entanto, são compensados pela sua capacidade em diminuir o metabolismo celular, essencial na preservação pulmonar em um ambiente hipoxêmico e com baixa oferta de substratos energéticos.

A refrigeração dos pulmões é realizada tanto pela solução de preservação quanto pelo resfriamento direto do órgão. Trabalhos apresentaram proposta de uso de soluções de perfusão a 22°C[61] e 23°C[62], seguidos de resfriamento tópico dos pulmões como sendo melhor que soluções em temperaturas de 10°C ou mesmo 30°C, contudo, ainda faltam estudos clínicos que sustentem o uso de soluções nestas temperaturas. Portanto, apesar das potenciais lesões que a infusão da solução fria possa fazer ao endotélio vascular, sua participação no processo de resfriamento e preservação dos pulmões é mais vantajosa, e a perfusão pulmonar com solução resfriada (em

torno de 4°C) ainda é recomendada pela maior parte dos centros de transplantes.

A temperatura ideal para a conservação dos pulmões ainda não é um consenso. A maioria dos centros mantém o órgão armazenado entre 0 e 10 °C, uma vez que pulmões preservados a mais de 10°C requerem uma quantidade superior de compostos metabólicos, têm tempo de isquemia menor e maior risco de lesão de reperfusão. Os órgãos, após a retirada, são acondicionados em sacos estéreis contendo solução de preservação ou salina e mantidos em recipientes com gelo para sua conservação até o implante. Com o desenvolvimento da técnica de perfusão pulmonar *ex vivo*, a refrigeração dos pulmões pode começar a ser menos necessária, tendo em vista que é possível mantê-los conservados em normotermia por um período de tempo superior aos praticados com a isquemia fria[10].

3.7 Ventilação e insuflação pulmonar durante o armazenamento

Os pulmões, como mencionado anteriormente, possuem uma particularidade em relação a outros órgãos, que é a capacidade de manter um metabolismo aeróbio durante o período de isquemia. Todavia, a presença de oxigênio na membrana alvéolo-capilar possui como desvantagem a indução de um aumento na produção de radicais livres de oxigênio causado pela peroxidação lipídica. A fração de oxigênio ideal para ser usada durante a perfusão e armazenamento dos pulmões ainda não é certa e, apesar de alguns grupos utilizarem concentrações de até 100% de oxigênio, a maioria dos centros prefere porcentagens menores que 50%, não somente durante o

período de perfusão, mas também durante o armazenamento, visando evitar lesões celulares por radicais livres.

Áreas pulmonares atelectasiadas não são bem perfundidas, devido à vasoconstrição reflexa do leito vascular. A ventilação pulmonar antes e durante a infusão da solução de preservação é fundamental para assegurar que os segmentos não permaneçam colapsados durante a perfusão. Contudo, vários autores alertam sobre os riscos da hiperinsuflação pulmonar e a correlaciona com aumento da permeabilidade capilar[63], injúria de reperfusão por barotrauma[64] e disfunção do enxerto[65].

Para evitar lesões alveolares e garantir segmentos sem atelectasias, o grupo de Toronto recomenda manobras de recrutamento pulmonar antes do início da perfusão e a ventilação com aproximadamente 10 mL/kg e pressão positiva expiratória final (PEEP) de 5 cmH_2O durante a perfusão. Os pulmões são, então, insuflados com um volume de 50% da capacidade pulmonar total ou uma pressão máxima de 20 cmH_2O e a traquéia clampeada[36,66]. A manutenção dos pulmões insuflados durante o armazenamento mantém a produção de surfactante e diminui a lesão de isquemia e reperfusão[10,67].

3.8 Perfusão pulmonar *ex vivo*

Atualmente, a utilização de um sistema de avaliação e recondicionamento pulmonar após a retirada dos pulmões do doador está entre as principais tentativas de diminuir a desproporção entre procura e demanda por pulmões para transplante. Esta técnica foi proposta inicialmente por Steen e colaboradores, do Grupo de Transplante Pulmonar de Lund, na Suécia, para

avaliação de pulmões retirados de um doador com coração parado[7], ou seja, doadores que houve parada cardiorrespiratória irreversível. Nestas condições não era possível avaliar a função pulmonar do doador antes da retirada dos órgãos. Assim, a intenção dos autores foi realizar uma avaliação da função pulmonar *ex vivo*, utilizando um ventilador mecânico e um circuito de circulação extracorpórea. Na ocasião, apenas o pulmão direito foi utilizado para transplante com bons resultados[7]. A técnica de avaliação *ex vivo* foi refinada e consolidada em estudo experimental em porcos, no qual se observou a manutenção de função pulmonar satisfatória tanto durante a avaliação *ex vivo* quanto após o transplante[8].

Desde os primeiros experimentos com doadores com coração parado, Steen e colaboradores aventaram a possibilidade do uso da técnica de avaliação *ex vivo* para pulmões que tivessem sido recusados para transplante de doadores cadavéricos convencionais[7], ou seja, em morte encefálica. De fato, trabalhos ulteriores foram publicados nos quais a técnica de avaliação *ex vivo* foi utilizada em pulmões humanos rejeitados para transplante pulmonar[9,10]. A recusa se deveu principalmente à baixa relação PaO_2/FiO_2. Nesses estudos, foi evidenciado que os pulmões previamente recusados poderiam ser recondicionados pela técnica *ex vivo*, tornando-os definitivamente aptos a serem transplantados[9,10]. O relato do primeiro transplante de um pulmão previamente rejeitado e aproveitado após o recondicionamento *ex vivo* realizado com sucesso em humanos foi publicado em 2007[11]. Posteriormente, o Grupo de Lund publicou resultados satisfatórios, após o seguimento de um ano, de espirometria e teste de caminhada de seis minutos de cinco pacientes

que receberam pulmões recondicionados pela técnica *ex vivo*. A técnica de recondicionamento *ex vivo* se mostrou factível e segura para uso clínico[12].

3.8.1 Solução de recondicionamento e normotermia

Dois fatores são apontados como fundamentais para o sucesso da técnica de recondicionamento *ex vivo*: 1) o uso de uma solução de alto gradiente de pressão coloidosmótica; e 2) a manutenção da normotermia[13].

A solução de recondicionamento utilizada foi desenvolvida pelo Grupo de Lund e chamada de Steen Solution®. A Steen Solution® é uma solução tamponada, do tipo extracelular (ou seja, com baixa concentração de potássio e alta concentração de sódio), contendo dextrano e albumina[8]. Sabe-se que a baixa concentração de potássio é menos lesiva à integridade estrutural e funcional das células endoteliais, podendo levar à diminuição na produção de oxidantes e vasoconstrictores[14].

O dextrano é uma macromolécula que, além de exercer função de aumento da pressão oncótica, melhora a capacidade de deformação das hemácias, previne a agregação eritrocitária e induz desagregação nas hemácias já agregadas, além de apresentar efeito antitrombótico por ação na superfície endotelial e plaquetária[14]. 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 quando da reperfusão[14]. A albumina tem a função, junto com o dextrano, de manter um alto gradiente de pressão coloidosmótica, no intuito de evitar o desenvolvimento de edema pulmonar durante o recondicionamento[8].

Assim como na solução de Steen®, a solução de para avaliação pulmonar de produção nacional foi produzida em uma base de cristalóide, glicose e dextran 40 com adição de albumina no momento do uso (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição da solução de produção nacional

Componente	Quantidade
Cloreto de Potássio	0,29g/L
Cloreto de Sódio	7,91g/L
Dextrano 40	49,5g/L
Gliconato de cálcio	0,53g/L
Glicose	2,3 g/L
Água para injetáveis asp	881mL
Albumina humana 20%*	119mL

Nota: * A albumina humana é adicionada no momento do preparo da solução para uso, totalizando 1 litro de solução.

O uso de isquemia fria, 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 essenciais, também está implicada com uma sucessão de eventos que propiciam a ativação de mediadores inflamatórios[15]. Entre esses eventos está a inativação da bomba Na/K-ATPase, com conseqüente edema celular[16]; o acúmulo de oxidantes, principalmente devido à resposta do endotélio, macrófagos e neutrófilos marginados à isquemia, levando aos efeitos deletérios da peroxidação lipídica[17,18]; a sobrecarga intracelular de cálcio potencializando a ação dos radicais livres[19]; a liberação de ferro livre promovendo as reações oxidativas e ativando a agregação plaquetária[20]; e a indução de morte celular, tanto na

forma de necrose como na forma de apoptose, ambas associadas a pior função pulmonar após a reperfusão[21,22].

Utilizando a técnica de recondicionamento *ex vivo*, Cypel e colaboradores demonstraram a preservação da função de pulmões submetidos a 12h de perfusão em normotermia[12]. Dessa forma, a possibilidade de manutenção da função pulmonar após períodos prolongados de normotermia poderia diminuir o efeito dos processos deletérios desencadeados pela isquemia fria. Além disso, poderia permitir a ação de processos reparadores habituais no pulmão lesado durante o período entre a extração e o implante[13].

3.8.2 Vantagens do recondicionamento pulmonar *ex vivo*

O principal benefício imediato da técnica de recondicionamento *ex vivo* seria o aumento substancial no número de pulmões disponíveis para transplante, levando à diminuição do tempo de espera e, conseqüentemente, à diminuição da mortalidade em lista de espera. Além disso, novas possibilidades seriam abertas para o uso de medidas terapêuticas específicas durante o processo de recondicionamento pulmonar. Por exemplo, antibióticos poderiam ser utilizados para combater infecções no pulmão doador, ou poder-se-ia lançar mão de estratégias ventilatórias diferenciadas para cada pulmão sob recondicionamento. Estas medidas poderiam melhorar os desfechos associados ao transplante pulmonar num futuro próximo[13].

4. Material e Métodos

4.1 Desenho experimental

Foram utilizados 16 pulmões humanos retirados de doadores em morte encefálica, considerados inadequados para o transplante pulmonar de acordo com os critérios utilizados em nosso Serviço, definidos pela ISHLT e a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos[5].

Os pulmões foram retirados mediante aprovação do Serviço de Procura de Órgãos e Tecidos (SPOT) e consentimento informado do responsável legal.

Todos os pulmões foram submetidos à perfusão anterógrada com Perfadex® (Vitrolife, Gotemburgo, Suécia) e acondicionados sob isquemia fria (4 a 8°C) por 10 horas. Após este período, os pulmões foram designados, por sorteio, para inclusão em um dos grupos:

- Grupo STEEN (n=8): recondicionamento *ex vivo* com Steen Solution® (Vitrolife AB).
- Grupo SRNac (n=8): recondicionamento *ex vivo* com solução de recondicionamento pulmonar de fabricação nacional.

O desenho experimental está esquematizado na figura 1.

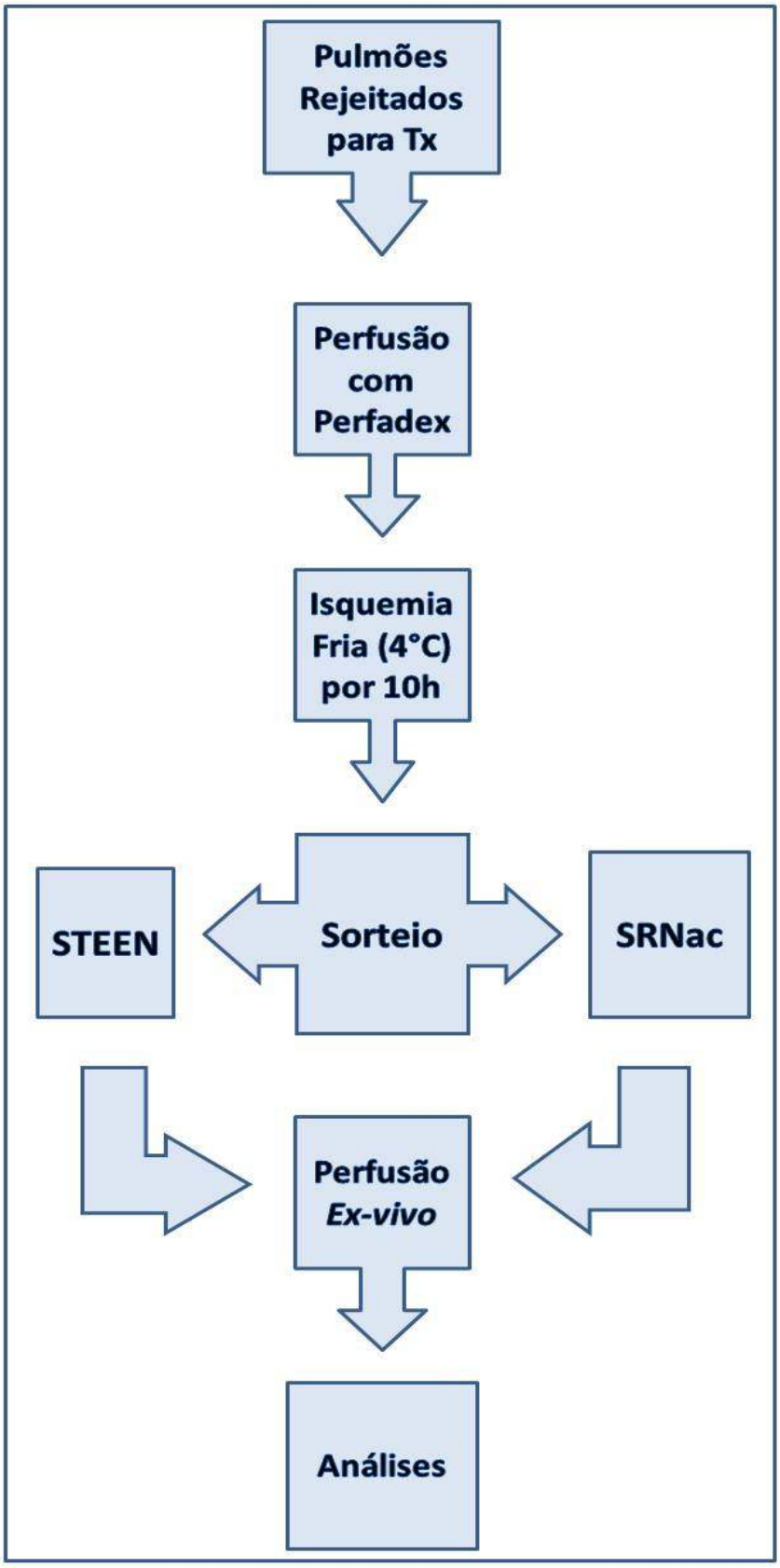


Figura 1 – Desenho experimental.

4.2 Perfusão pulmonar

O doador foi posicionado em decúbito dorsal horizontal, com coxim sob as escápulas. Foi realizada esternotomia mediana, seguida de abertura do pericárdio e das pleuras mediastinais. Na seqüência, as veias cavas superior (VCS) e inferior (VCI) foram dissecadas e reparadas, e uma sutura em bolsa foi realizada com fio de polipropileno 4-0 no tronco pulmonar, seguida da introdução de uma cânula de perfusão.

Após a heparinização (250-300 UI/kg) do doador, foram injetadas 500µg de prostaglandina E1 (Bedfordalprost®, Ben Venue Laboratories, EUA) no tronco da artéria pulmonar. Nesse momento, foi realizada a primeira biópsia pulmonar no lobo médio.

Em seguida, a VCS foi ligada e a VCI seccionada acima do diafragma. Após pinçamento da aorta ascendente, iniciou-se a perfusão pulmonar com 3 litros (50 a 75 mL/kg) da solução de preservação (Perfadex®) a 4°C. Uma incisão de cerca de dois centímetros foi feita na aurícula esquerda para drenagem da solução de preservação. Solução salina gelada foi colocada nas cavidades pleurais para o resfriamento dos pulmões enquanto todo o sangue do doador era aspirado.

A ventilação pulmonar foi mantida durante todo o processo de perfusão a fim de permitir uma perfeita distribuição da solução de preservação e evitar a formação de atelectasias.

4.3 Extração pulmonar

Terminada a perfusão, a cânula foi retirada e iniciou-se a extração dos pulmões, com o cuidado de que as veias pulmonares de cada lado ficassem unidas por um retalho atrial, com a presença de tênue camada de musculatura do átrio esquerdo. A VCS foi seccionada logo abaixo da ligadura, liberando-a da artéria pulmonar direita. A aorta foi seccionada próximo ao local de pinçamento e o tronco pulmonar seccionado antes da sua bifurcação, permitindo a retirada definitiva do coração.

A liberação dos pulmões teve início pela secção dos ligamentos pulmonares. Foi liberado todo o tecido mediastinal anterior ao esôfago, desde o diafragma até dois ou três anéis traqueais acima da carina. Após a liberação dos pulmões e dissecção da traquéia distal, esta foi pinçada com os pulmões insuflados. Após a secção traqueal, os pulmões foram retirados do campo operatório. Foram retiradas em bloco todas as estruturas torácicas, incluindo todo o pericárdio e estruturas adjacentes, artéria e veias pulmonares. Em seguida, os pulmões foram imersos em soro fisiológico gelado e transportados em recipiente térmico, mantendo-se a temperatura entre 4 e 8°C, até o Laboratório de Cirurgia Experimental do Instituto do Coração do HC/FMUSP.

Na chegada ao InCor, o bloco pulmonar era pesado e novamente acondicionados em sacos para serem colocados em um refrigerador a 4°C por 10 horas. Após 10 horas de isquemia fria, uma segunda biópsia pulmonar foi realizada no lobo médio, os pulmões eram novamente pesados e, logo a seguir, foram submetidos à técnica de recondicionamento pulmonar *ex vivo*.

4.4 Técnica de recondicionamento pulmonar *ex vivo*

O recondicionamento pulmonar foi realizado segundo a técnica *ex vivo* descrita por Steen e colaboradores e modificada por Cypel e colaboradores[10,13].

Foi utilizado um recipiente plástico rígido e transparente (XVIVO®, Vitrolife, Guthenburg, Suécia) onde foram acondicionados os pulmões (figura 2). Ao recipiente foi conectado um circuito de circulação extracorpórea composto por uma bomba centrífuga, um regulador de temperatura, um oxigenador de membrana e sensores de temperatura e fluxo (figura 3). O sistema foi preenchido com 1,5 litros da solução de recondicionamento (Steen Solution® ou solução de recondicionamento de fabricação nacional).

Figura 2 – Caixa para suporte do bloco pulmonar (XVIVO© Chamber) no sistema de perfusão pulmonar *ex vivo.*

O oxigenador de membrana, utilizado para desoxigenar a solução de reperfusão, estava ligado a um misturador de gases que recebia fluxo de duas fontes: uma de oxigênio puro e outra de uma mistura de 7% de CO_2 e 93% de N_2. O fluxo dos gases foi ajustado até que os valores gasométricos da solução

de reperfusão fossem similares ao do sangue venoso humano. Ao inicio da reperfusão, o misturador de gases era ajustado em 35%, permitindo a injeção de aproximadamente 15% de oxigênio no sistema antes do início da ventilação. Uma amostra do perfusato era colhida neste momento para análise em um aparelho de gasometria. O fluxo do misturador, inicialmente em 0,5 l/min, era ajustado para manter a $PaCO_2$ entre 30 e 35 mmHg. O pH era mantido em níveis fisiológicos pela adição de 1 ml de trometamol (Addex-THAM®; Fresenius-Kabi, Uppsala, Suécia) para cada 1 mmol negativo do *base excess*. Após o início da ventilação, a mistura de gases foi alterada para 7% de CO_2 e 93% de N_2, sem O_2. Desta forma, todo o oxigênio detectado na gasometria era oriundo da troca gasosa pulmonar.

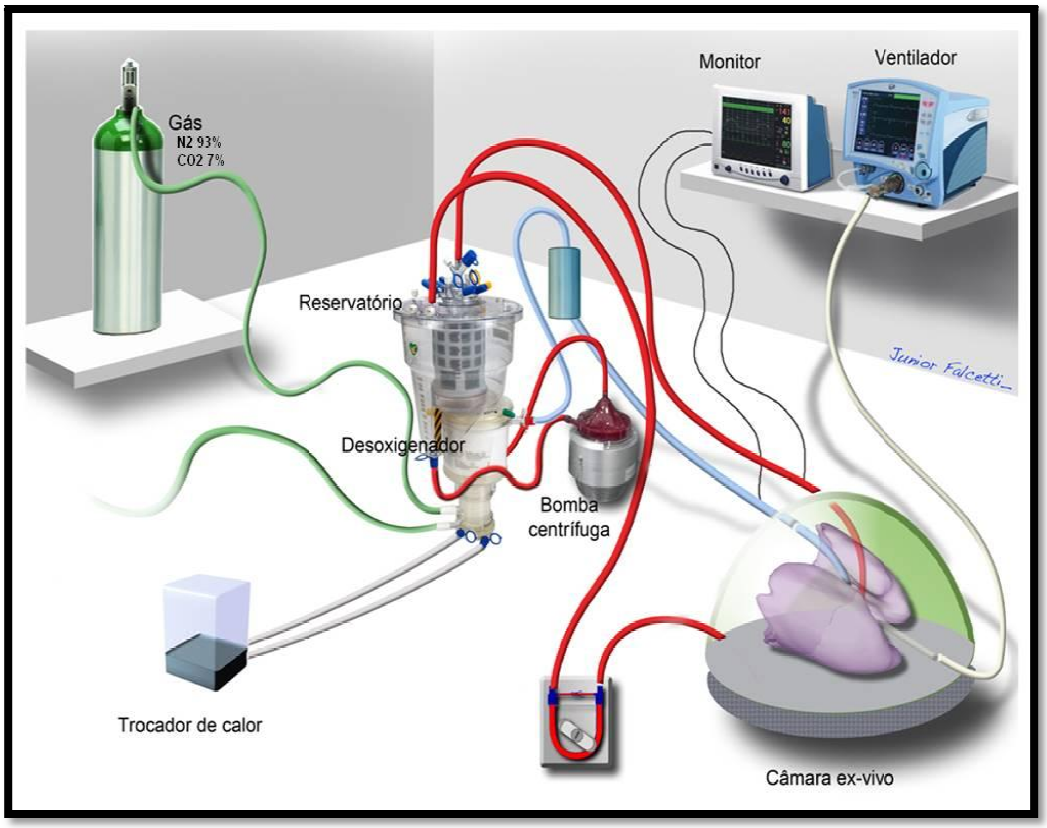


Figura 3 – Sistema de perfusão pulmonar *ex vivo*.

A artéria pulmonar e a traquéia foram canuladas e conectadas diretamente ao circuito (figura 4). O sangue proveniente das veias pulmonares foi coletado no recipiente plástico e drenado para o circuito. Um sensor de pressão foi conectado à cânula da artéria pulmonar (figura 5); um sensor de fluxo foi conectado ao circuito logo antes da cânula da artéria pulmonar; e um sensor digital de temperatura foi colocado no interior de uma das veias pulmonares.

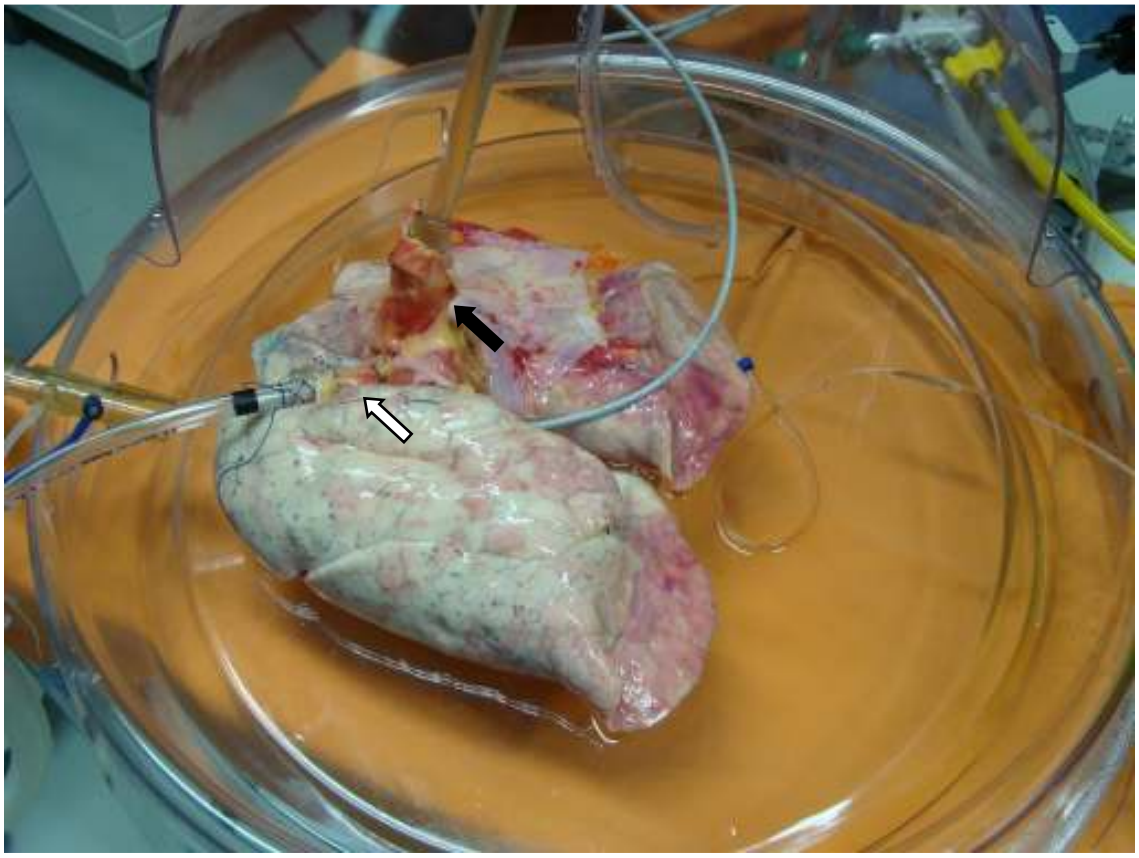


Figura 4 – Detalhe da canulação do bloco pulmonar: tubo orotraqueal introduzido na traquéia (seta branca) e cânula acoplada ao tronco da artéria pulmonar (seta preta).

A reperfusão foi iniciada com um fluxo de 100 mL/min a 25°C. Os pulmões foram gradualmente aquecidos pela elevação da temperatura da solução de recondicionamento por meio do regulador de temperatura. O fluxo

era elevado gradualmente (Tabela 2) até atingir o fluxo máximo, calculado como 40% do débito cardíaco estimado. Este era determinado a partir do tamanho do doador: três vezes a área de superfície corpórea (considerando o índice cardíaco de 3 l/min/m^2). Durante todo o processo, a PAP era monitorizada e mantida abaixo de 20 mmHg, a fim de minimizar a formação de edema. Se a PAP atingisse 20 mmHg antes do fluxo máximo calculado, a elevação deste era interrompida e o valor anotado como o fluxo alcançado.

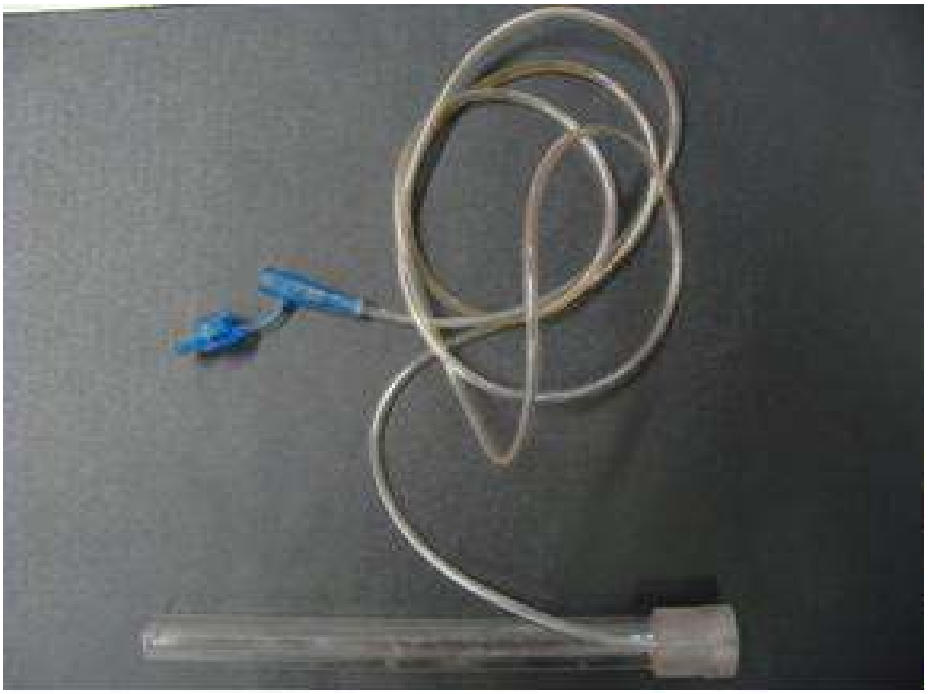


Figura 5 – Detalhe da cânula da artéria pulmonar (à esquerda). Nota: A sonda embutida na cânula era conectada a um transdutor de pressão permitindo a monitorização contínua da pressão de artéria pulmonar.

A temperatura também era continuamente monitorizada através de um sensor retal de temperatura colocado em uma das veias pulmonares e conectado ao termômetro clínico digital AG-2000. A temperatura era elevada lentamente até atingir a normotermia (37 °C) aos 30 minutos de reperfusão (Tabela 3).

Tabela 3 – Estratégia para execução da perfusão pulmonar *ex vivo*

Tempo de perfusão (min)	**0**	**10**	**20**	**30**	**40**	**50**	**60**
Temperatura (°C)	20	30	32	37	37	37	37
Fluxo (% do fluxo máximo calculado)	10	10	20	30	50	80	100
Ventilação (ml/kg)	-	-	6	6	7	8	8

Quando a temperatura atingia 32 °C (em torno de 20 min de reperfusão), a ventilação era iniciada e o misturador de gases ajustado para 21%. Com isso, o oxigenador de membrana recebia somente a mistura de nitrogênio e gás carbônico, passando a atuar como um “desoxigenador”. O tubo orotraqueal era conectado a um ventilador com os seguintes ajustes iniciais: volume corrente de 6 ml/kg, freqüência de 7/min, PEEP de 5 cmH_2O e FiO_2 de 100 %. O volume corrente inicial era então elevado gradualmente até atingir 8 ml/kg do peso ideal do doador.

Após 60 minutos de reperfusão pulmonar *ex vivo*, era colhida uma amostra do perfusato que entrava na artéria pulmonar e uma amostra do perfusato que drenava das veias pulmonares para análise gasométrica. Novo fragmento era retirado do lobo médio para análise histológica. O bloco pulmonar era pesado e o pulmão esquerdo separado do bloco para cálculo da razão peso úmido-peso seco.

4.5 Variáveis de estudo

4.5.1 Avaliação do edema pulmonar

O bloco pulmonar foi pesado em três momentos: 1) chegada ao InCor; 2) após o período de isquemia fria; e 3) após o recondicionamento no sistema *ex vivo*.

Para a análise da razão entre o peso úmido e o peso seco, apenas o pulmão esquerdo foi utilizado, sendo pesado após a avaliação no sistema *ex vivo* (peso úmido) e após 24h em estufa a 60 ºC (peso seco).

4.5.2 Função pulmonar

Amostras da solução de reperfusão obtidas das veias pulmonares foram analisadas com auxílio de um gasômetro. As seguintes medidas foram realizadas: pH, pressão parcial de O_2 (PaO_2), pressão parcial de CO_2 ($PaCO_2$).

O principal parâmetro da avaliação funcional era a capacidade de oxigenação (ΔPO_2), definida pela fórmula (1) abaixo, na qual PvO_2 era a pressão parcial de oxigênio no perfusato que entrava na artéria pulmonar e PaO_2 a pressão parcial de oxigênio no perfusato que saía das veias pulmonares.

$$\mathbf{\Delta PO_2\ (mmHg) = PaO_2\ (mmHg) - PvO_2\ (mmHg)} \qquad \mathbf{(1)}$$

E a capacidade relativa de oxigenação expressa pela fórmula (2)[30]:

$$\mathbf{CRO = [PaO_2 - PvO_2] \times 100/PvO_2} \qquad \mathbf{(2)}$$

A resistência vascular pulmonar (RVP) foi calculada indiretamente pela fórmula (3):

RVP = [(PAP – PAE)/FAP] x 80 (3)

Onde: PAP = Pressão média de artéria pulmonar

PAE = Pressão de átrio esquerdo

FAP = Fluxo arterial pulmonar

Atribuiu-se o valor zero para a PAE devido à ausência do coração no sistema.

Durante a ventilação dos pulmões, o ventilador exibia os valores do volume corrente (Vc) aplicado, pressão de platô da via aérea (Pp), freqüência respiratória e pressão positiva no final da expiração (PEEP). Após 1 hora de reperfusão, esses valores eram anotados para o cálculo da complacência (estática) pulmonar (CP) conforme fórmula (4) abaixo.

CP (ml/cmH_2O) = Vc (ml) / Pp (cmH_2O) - PEEP (cmH_2O) (5)

4.5.3 Avaliação histológica

4.5.3.1 Microscopia ótica

Fragmentos retirados antes da isquemia, antes e após a reperfusão foram fixados em solução tamponada de formaldeído a 4% por 24h e a seguir embebidos em parafina. Cortes de 5 µm foram realizados e corados com

hematoxilina e eosina. Foi realizada análise semiquantitativa, baseada na avaliação de 13 parâmetros como apresentado na tabela 4.

Foi utilizada uma graduação padronizada das alterações numa escala de 0 a 3, sendo: 0 = sem alteração; 1 = alteração discreta; 2 = alteração moderada; e 3 = alteração intensa. Dessa forma, o escore de lesão pulmonar (ELP) foi determinado pela somatória do valor te todos os parâmetros, podendo variar de 0 (nenhuma lesão) a 39 (lesão total)[68,69].

Tabela 4 – Variáveis analisadas na escala da avaliação histológica

Edema intersticial	Exsudato alveolar	Fibrina alveolar
Edema alveolar	Hemorragia intersticial	Reatividade de pneumócitos
Espessamento arteriolar	Hemorragia alveolar	Macrófagos alveolares
Trombose vascular	Infiltrado inflamatório intersticial	Necrose
Fibrose intersticial		

4.5.3.2 Avaliação de apoptose

Fragmentos do pulmão direito foram submetidos à avaliação de apoptose pelo método TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit – POD, Roche). As lâminas brancas foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol de 5 minutos cada (1 a 60 ºC, e dois à temperatura ambiente), reidratadas em gradiente de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%) e incubadas com proteinase K por 30 min à temperatura ambiente. Após lavagem por 2 banhos de 3 minutos em PBS, foram incubadas em metanol por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, lavadas 2 vezes em PBS e após a secagem da área em torno da amostra, foram pipetados 50 µL da mistura de reação TUNEL, sendo 5 µL da solução de enzima (tubo 1 blue) mais 45 µL da solução de marcador (tubo 2-violeta), que marcou as fitas de DNA por TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase), o qual

catalisa polimerização de nucleotídeos marcados de extremidades livres 3'-OH de uma maneira independente (reação de TUNEL), por amostra. Foram incubadas as amostras sob parafilme em câmara úmida a 37ºC por 60 minutos, e após o período de incubação foi realizada a lavagem por 3 vezes em PBS. Por fim, as lâminas foram montadas com lamínulas de vidro, glicerina e PBS.

As lâminas foram examinadas em microscópio (Axioskop 2 Plus; Carl Zeiss, Jena, Alemanha) de fluorescência, através de um filtro de 590 nm, com um aumento de x400. O sistema incluía uma câmera acoplada ao microscópio para captura das imagens, ligada a um computador (figura 6). Através do programa de processamento de imagens digitais AxioVision versão 4.7 (Carl Zeiss), a imagem era mostrada no monitor em um campo de 0,02 mm^2, e as células apoptóticas eram visualizadas na cor verde brilhante (figura 7). As células apoptóticas foram contadas em cinco campos escolhidos aleatoriamente (área total de 0,1 mm^2; aumento de x400).

Figura 6 – Microscópio de fluorescência Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com câmera filmadora e monitor usados para a contagem de células apoptóticas.

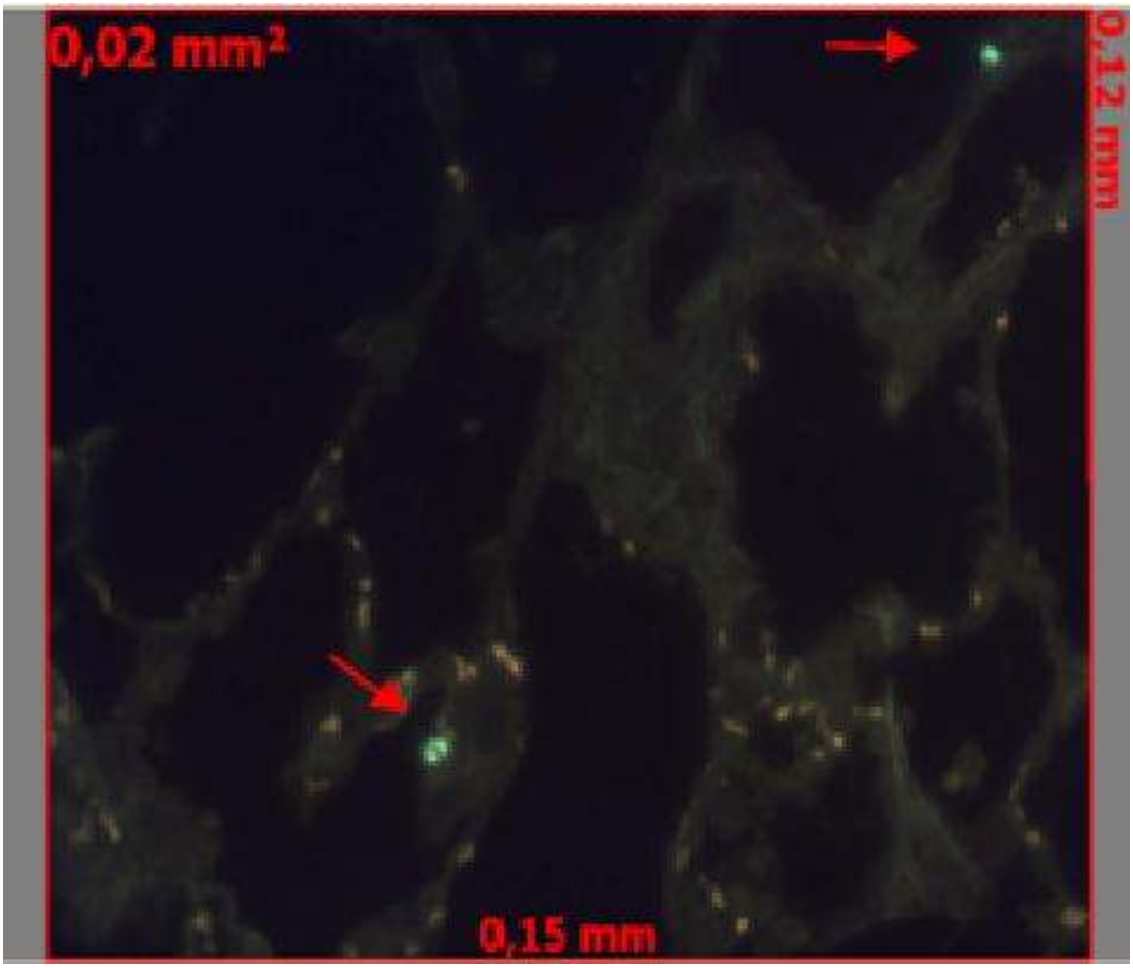


Figura 7 – Representação da técnica de identificação de células apoptóticas (setas vermelhas) usando o programa de análise de imagem AxioVision a partir de imagens captadas pelo microscópio de fluorescência em aumento de 400 vezes.

4.5.4 Análise estatística

As análises descritivas foram realizadas apresentando médias e desvios padrão para variáveis de distribuição normal. Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados com o teste de Shapiro-Wilk e com o teste de Levene, respectivamente.

A comparação dos grupos quanto às características clínicas e demográficas dos doadores foi efetuada com o teste qui-quadrado (ou exato de

Fisher) para as variáveis categóricas e teste t de Student para as variáveis contínuas. Já a análise estatística das variáveis de desfecho que foram coletadas uma única vez ao longo do estudo foi realizada utilizando-se o teste t de Student para variáveis de distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para variáveis que não tiveram distribuição normal.

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 13.0.

5. Resultados

As captações dos 16 blocos pulmonares ocorreram no período de abril de 2009 a setembro de 2010. Os doadores tinham idade média de 44,6 ± 19,0 anos, sendo 7 homens e 9 mulheres. A maioria desses pulmões foi rejeitada pelas equipes transplantadoras por função pulmonar ruim, avaliada através da gasometria arterial, a qual se mostrou insatisfatória em 14 casos (PaO_2 inferior a 300 mmHg com FiO_2 de 100% e PEEP de 5 cmH_2O). Em outros 2 casos, o motivo de recusa foi incompatibilidade com o receptor e pneumonia. A PaO_2 arterial média encontrada entre os doadores foi de 203,2 ± 19,0 mmHg. A principal causa de óbito entre os doadores foi acidente vascular cerebral (AVC) hemorrágico (9 doadores). Outras causas de óbito foram: hemorragia subaracnóide (2 doadores), encefalopatia anóxica (2 doadores), trauma crânio-encefálico (1 doador) e ferimento por arma de fogo (1 doador). Os grupos estudados apresentaram homogeneidade com relação às características clínicas e demográficas avaliadas pré-perfusão, como pode ser observado a partir da tabela 5.

Tabela 5 – Homogeneidade dos grupos: características clínicas e demográficas

CARACTERÍSTICA DO DOADOR	STEEN n=8	SRNac n=8	VALOR *p*
IDADE (anos)	50,25 ± 19,42	39,12 ± 18,00	0,26
GÊNERO (F/M)*	1,66	1,00	0,99
IMC (kg/cm^2)	26,70 ± 3,69	25,11 ± 3,40	0,39
COMORBIDADES (%)	62,50	62,50	0,99
TABAGISMO (%)	25,00	37,50	0,99
PNEUMONIA (%)	50,00	12,50	0,28
TEMPO_UTI (dias)	5,87 ± 3,35	3,50 ± 2,13	0,11
VM (dias)**	5,87 ± 3,35	3,50 ± 2,13	0,11
LEUCOMETRIA (mm^3)	16.710,00 ± 5.244,61	15.851,25 ± 7.016,96	0,79
PaO_2 (mmHg)***	206,04 ± 119,25	200,40 ± 58,20	0,91
$PaCO_2$ (mmHg)***	37,66 ± 15,48	36,74 ± 15,43	0,91

Nota: As variáveis contínuas estão expressas em média ± desvio padrão e as variáveis categóricas por seu número relativo.

* Relação Feminino/Masculino

** Tempo que o doador ficou em ventilação mecânica (VM).

*** Gasometria arterial colhida com FiO_2 = 100% e PEEP = 5 cmH_2O.

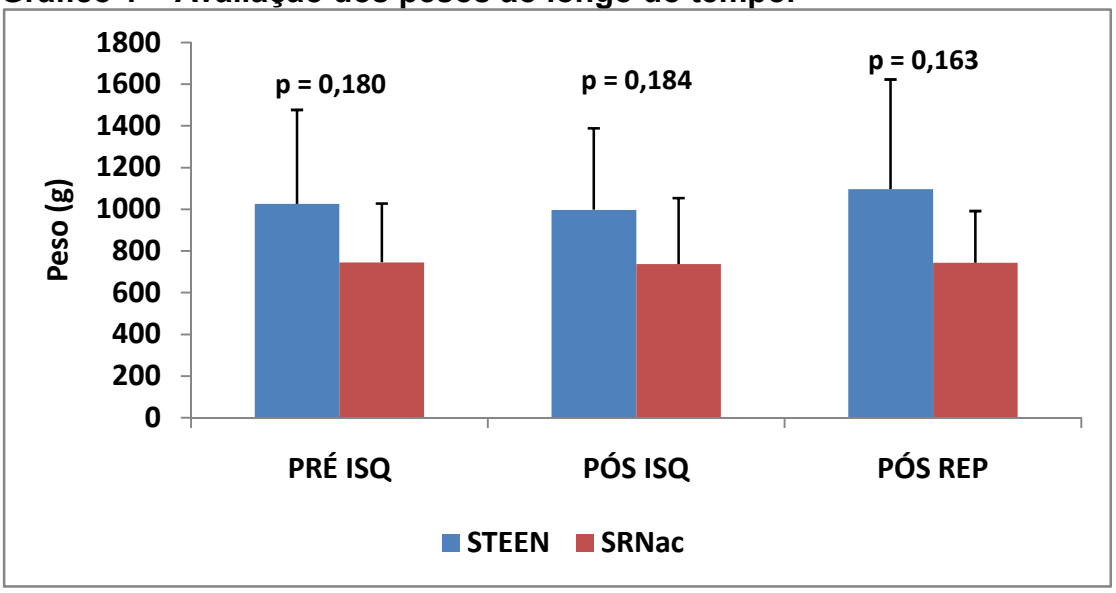
5.1 Avaliação do edema pulmonar

O peso do bloco pulmonar foi igual em ambos os grupos nos três momentos de avaliação: início da isquemia (chegada ao InCor): STEEN = 1.026 ± 451 g, SRNac = 745 ± 282 g, p = 0,180; fim da isquemia: STEEN = 998

± 391 g, SRNac = 738 ± 316 g, p = 0,184; e fim da reperfusão: STEEN = 1.097 ± 526 g, SRNac = 743 ± 248 g; p = 0,163), conforme o gráfico 1.

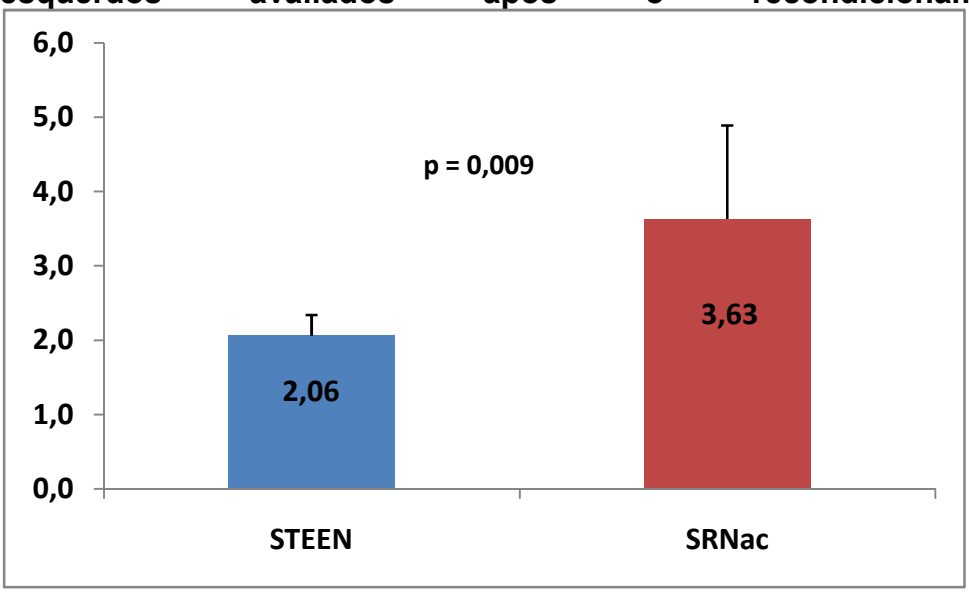
A relação entre o peso úmido e o peso seco dos pulmões esquerdos avaliados após o recondicionamento foi maior no grupo reperfundido com a solução nacional (SRNac = 3,63 ± 1,26; STEEN = 2,06 ± 0,28; p = 0,009) (gráfico 2).

Gráfico 1 – Avaliação dos pesos ao longo do tempo.



Peso dos blocos pulmonares na chegada ao InCor (PRÉ ISQ), após 10 horas de isquemia fria (PÓS ISQ) e após 60 minutos de recondicionamento (PÓS REP).

Gráfico 2 – Relação entre o peso úmido e o peso seco dos pulmões esquerdos avaliados após o recondicionamento.



5.2 Avaliação funcional

Os valores de PaO2 foram equivalentes entre os grupos tanto no momento da captação dos pulmões (STEEN = 206,04 ± 119,25 mmHg, SRNac = 200,40 ± 58,20 mmHg, p = 0,906) quanto após o período de recondicionamento (STEEN = 498,00 ± 37,53 mmHg, SRNac = 521,00 ± 55,43 mmHg, p = 0,348) (gráfico 3).

Também não houve diferença entre os grupos quanto à capacidade relativa de oxigenação calculada ao final do recondicionamento, sendo de 501,37 ± 207,77 nos pulmões do grupo STEEN, e de 470,30 ± 232,41 no grupo SRNac (p=0,782; gráfico 4).

Gráfico 3 – PaO_2 dos blocos pulmonares no momento da captação (PRÉ ISQ) e após 60 minutos de recondicionamento (PÓS REP).

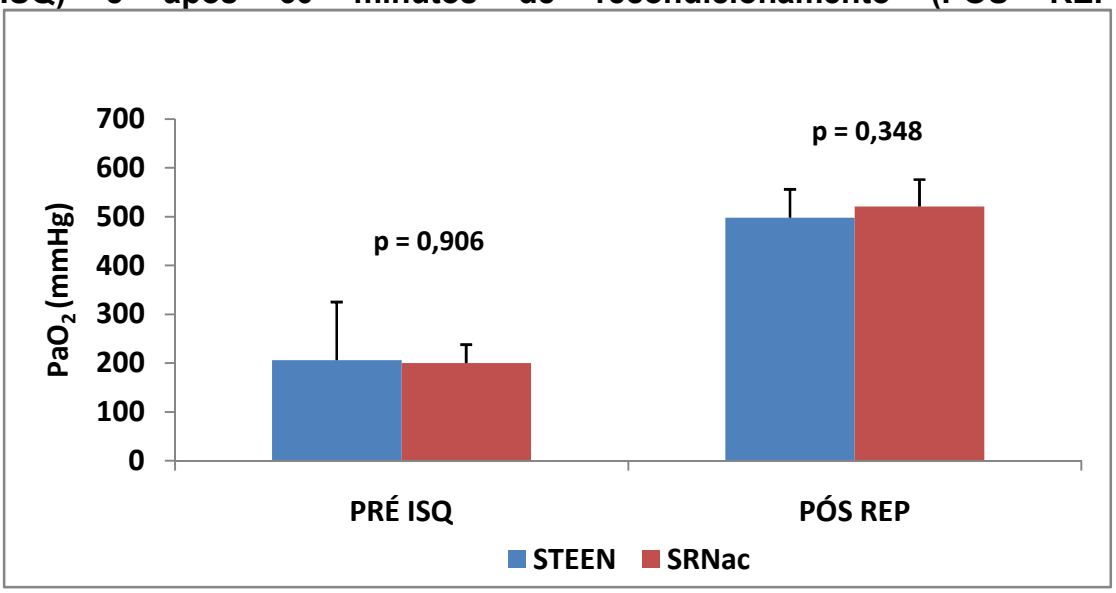
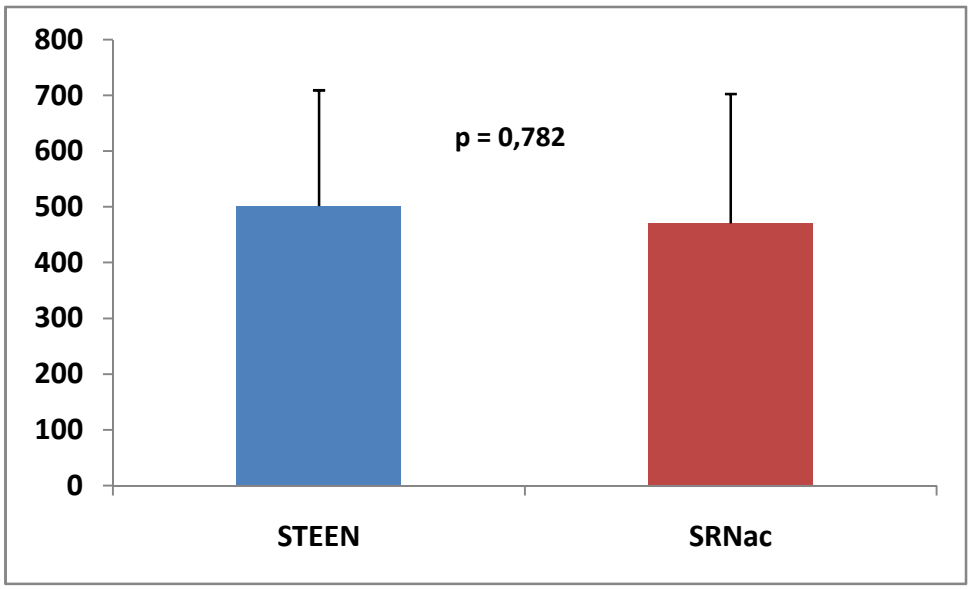


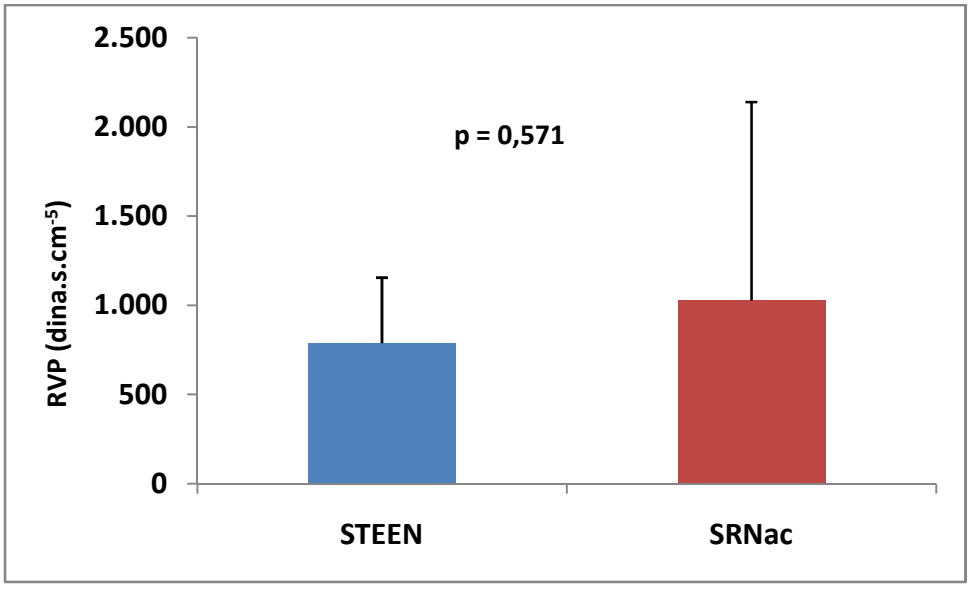
Gráfico 4 – Capacidade Relativa de Oxigenação (ROC) dos blocos pulmonares dos grupos STEEN (Steen Solution®) e SRNac (solução de recondicionamento de fabricação nacional) após o recondicionamento.



5.3 Avaliação hemodinâmica

A Resistência Vascular Pulmonar (RVP) medida após 60 minutos de reperfusão nos pulmões do grupo STEEN foi de 787,99 ± 367,23 dina.s.cm^{-5}, enquanto no grupo SRNac esse valor foi de 1.026,81 ± 1.112,53 dina.s.cm^{-5}, com p = 0,575, como observado no gráfico 5.

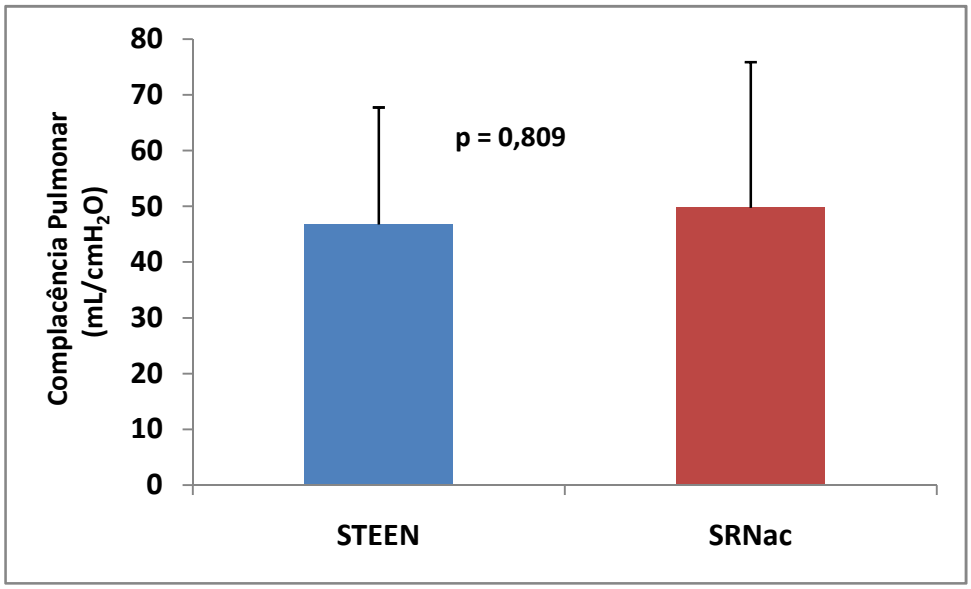
Gráfico 5 – Resistência Vascular Pulmonar dos blocos pulmonares dos grupos STEEN (Steen Solution®) e SRNac (solução de recondicionamento de fabricação nacional) após o recondicionamento.



5.4 Mecânica ventilatória

A complacência pulmonar média observada ao final da reperfusão nos pulmões do grupo STEEN foi de 46,75 ± 20,99 mL/cmH_2O. Os pulmões perfundidos com SRNac apresentaram uma complacência média de 49,74 ± 26,11 cmH_2O. Não houve diferença estatística (p = 0,809) entre os dois grupos quanto à complacência pulmonar (gráfico 6).

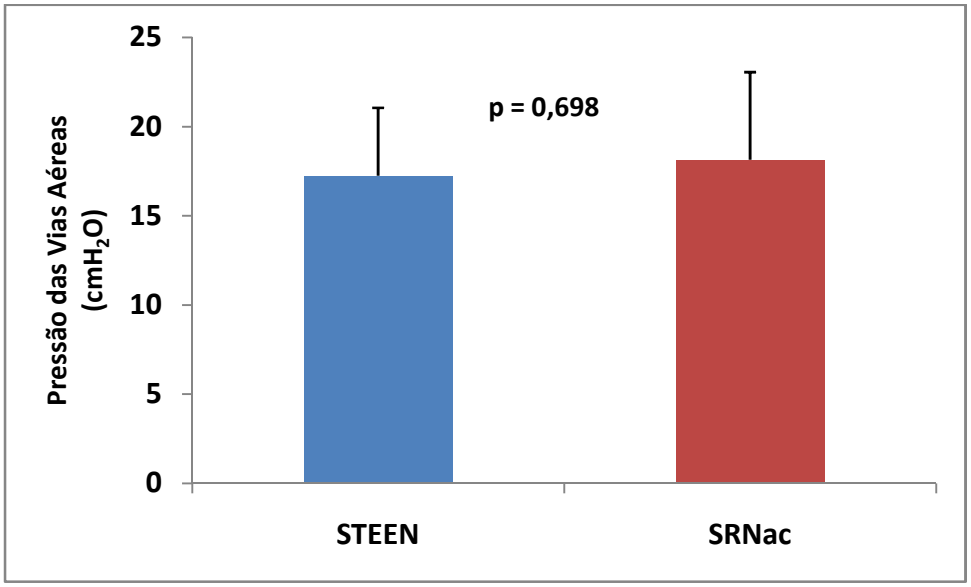
Gráfico 6 – Complacência pulmonar medida nos grupos STEEN (Steen Solution®) e SRNac (solução de recondicionamento de fabricação nacional) após o recondicionamento.



5.5 Pressão de Vias Aéreas

A pressão de vias aéreas, medida após 60 minutos de reperfusão, foi similar nos dois grupos (STEEN = 17,25 ± 3,81 cmH_2O; SRNac = 18,14 ± 4,91 cmH_2O; p = 0,698), como ilustrado no gráfico 7.

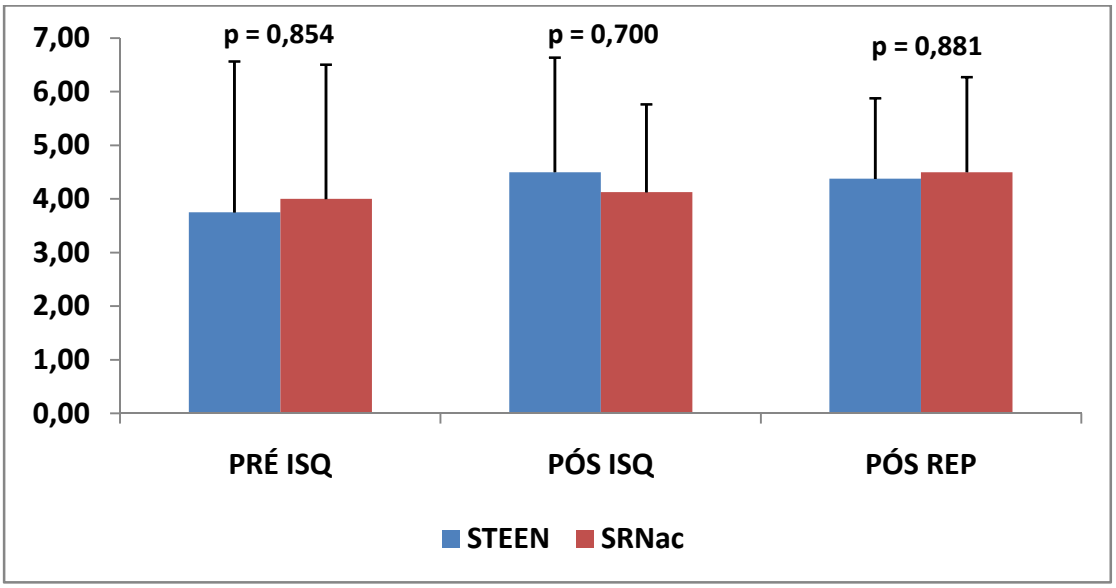
Gráfico 7 – Pressão de vias aéreas medida nos grupos STEEN (Steen Solution®) e SRNac (solução de recondicionamento de fabricação nacional) após o recondicionamento.



5.6 Análise Histológica

O Escore de Lesão Pulmonar (ELP) foi igual em ambos os grupos nos três momentos de avaliação: antes da isquemia: STEEN = 3,75 ± 2,82, SRNac = 4,00 ± 2,51, p = 0,854; fim da isquemia: STEEN = 4,50 ± 2,14, SRNac = 4,13 ± 1,64, p = 0,700; e fim da reperfusão: STEEN = 4,38 ± 1,51, SRNac = 4,50 ± 1,77; p = 0,881), conforme o gráfico 8.

Gráfico 8 – Escore de lesão pulmonar.

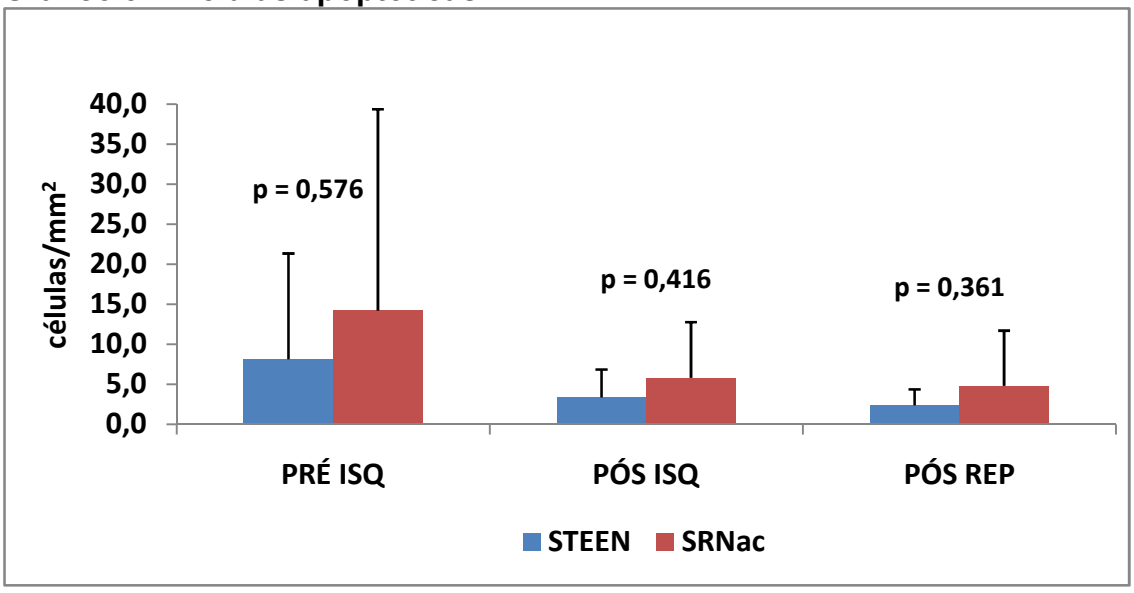


*** Biópsias dos lobos médios no momento da captação (PRÉ ISQ), após 10 horas de isquemia fria (PÓS ISQ) e após 60 minutos de recondicionamento (PÓS REP). Não houve diferença entre os grupos STEEN (Steen Solution®) e SRNac (solução de recondicionamento de fabricação nacional) nos momentos avaliados.**

5.7 Apoptose

O número de células apoptóticas também foi similar em ambos os grupos nos três momentos de avaliação: antes da isquemia: STEEN = 8,1 ± 13,2 cel/mm^2, SRNac = 14,2 ± 25,2 cel/mm^2, p = 0,576; fim da isquemia: STEEN = 3,4 ± 3,5 cel/mm^2, SRNac = 5,8 ± 7,0 cel/mm^2, p = 0,416; e fim da reperfusão: STEEN = 2,4 ± 2,0 cel/mm^2, SRNac = 4,8 ± 6,9 cel/mm^2; p = 0,361), conforme o gráfico 9.

Gráfico 9 – Células apoptóticas



*** Biópsias dos blocos pulmonares no momento da captação (PRÉ ISQ), após 10 horas de isquemia fria (PÓS ISQ) e após 60 minutos de recondicionamento (PÓS REP).**

6. Discussão

O transplante se tornou, há pelo menos três décadas, o principal tratamento para várias doenças pulmonares em estádio avançado de desenvolvimento. No entanto, diversos fatores concorrem para que o número de órgãos disponíveis e adequados para o transplante seja muito inferior ao de pacientes incluídos nas listas de espera por esse tratamento. Graças ao desenvolvimento de soluções de perfusão mais apropriadas e às adequações e melhorias feitas nos circuitos de perfusão, o recondicionamento pulmonar ex vivo, apesar de não ser uma técnica nova, é hoje uma das mais importantes tentativas de reverter esse quadro, possibilitando uma maior oferta de enxertos viáveis aos pacientes.

Dentre os motivos elencados para o sucesso dessa técnica pode-se citar a possibilidade de: inspecionar os pulmões de maneira mais meticulosa; remover de forma mais efetiva as secreções brônquicas e os coágulos da circulação pulmonar; adotar um padrão de ventilação em que todo o volume e pressão são distribuídos para os pulmões de maneira mais uniforme, por não haver a interferência da caixa torácica e do diafragma, além de, por meio de manobras de recrutamento, desfazer as áreas com atelectasias, melhorando, assim, a relação ventilação/perfusão[70,71].

Seguindo a tendência mundial dos principais centros transplantadores, o Grupo de Transplante Pulmonar do InCor-HC/FMUSP já vem utilizando a técnica de recondicionamento ex vivo desde 2008, trazendo contribuições para

área[16,68,72,73]. No entanto, dados os problemas já enfrentados em relação aos trâmites burocráticos e altos custos para importação das principais soluções de preservação, nosso objetivo principal foi validar uma nova solução de recondicionamento de fabricação nacional com, no mínimo, a mesma capacidade de recuperação dos pulmões que a Steen Solution® vem demonstrando.

A Steen Solution® é a solução de recondicionamento mais utilizada atualmente, tanto experimental quanto clinicamente, devido à sua alta capacidade de recuperar pulmões recusados para o transplante por não preencherem os critérios mínimos de funcionalidade, sendo a PaO_2 um dos principais. De fato, em nosso estudo, a PaO_2 medida no momento da captação dos enxertos foi, em média, de 200 mmHg, similar ao observado em outros estudos[16,68,72,73], e muito abaixo dos 300 mmHg (FiO_2 = 100% e PEEP = 5 cm H_2O) preconizados para o doador ideal[74].

Entretanto, os estudos mostram que, após o período de recondicionamento com a perfusão de Steen Solution®, os valores médios de PaO_2 chegam a atingir de 380[71,75] a 500[68] mmHg, como observado em nosso estudo, mesmo nos pulmões recondicionados com a solução nacional. Interessante ainda notar que, apesar do maior tempo de ventilação mecânica dos nossos doadores e do estudo de Medeiros et al.[68], cerca de 5 e 7 dias, respectivamente, os valores de PaO_2 após o recondicionamento foram maiores que os alcançados nos estudos de Wierup et al.[71] e Egan et al.[75], nos quais os doadores permaneceram apenas por 2 dias, em média, sob ventilação mecânica.

A eficiência das soluções de recondicionamento usadas no presente estudo ficou comprovada também pelos valores calculados da capacidade relativa de oxigenação, que revelaram uma adequada troca gasosa realizada pelos pulmões após 60 minutos de perfusão. Aliás, esses dados corroboram uma das alterações feitas por Cypel et al.[10] sobre o protocolo inicial desenvolvido por Steen et al.[67], qual seja, de usar apenas a solução de recondicionamento para a perfusão do órgão, sem adição de concentrado de hemácias. Com isso, demonstraram não apenas que era possível garantir e verificar a troca gasosa diretamente na solução circulante, como também evitar os prejuízos da hemólise, que normalmente se observa nos circuitos de circulação extra-corpórea, mesmo com um hematócrito de aproximadamente 15%[67]. Dessa forma, a solução nacional testada em nosso estudo foi equivalente à Steen Solution®.

Um dos benefícios mais marcantes do recondicionamento ex vivo com a Steen Solution® é a redução do edema pulmonar devido à alta pressão oncótica desse perfusato, determinada pela presença de albumina e dextran em sua composição. Além disso, o dextran tem propriedades antitrombóticas e reveste a superfície endotelial da circulação pulmonar e dos tubos do circuito[70]. Na verdade, o edema pulmonar é um fator geralmente presente no processo de isquemia-reperfusão, devido ao aumento da permeabilidade vascular e à ruptura da barreira alvéolo-capilar. Essa maior ou menor retenção de água no tecido pulmonar está diretamente relacionada à viabilidade ou à disfunção do enxerto, refletindo a qualidade da preservação[36].

No presente estudo, a solução de recondicionamento de fabricação nacional foi menos eficiente em evitar a formação de edema nos pulmões, medido através da razão entre o peso úmido (logo após a perfusão por 60 minutos) e o peso seco (após 24 horas em estufa). No entanto, esse evento parece não ter causado prejuízo significante para a troca gasosa, já que, conforme discutido anteriormente, a PaO2 e a capacidade relativa de oxigenação foram boas em todos os pulmões recondicionados, independentemente do tipo de solução usada. Além disso, o peso dos blocos pulmonares registrado em três momentos ao longo do experimento - logo após a captação, após 10 horas de isquemia fria, e após 60 minutos de recondicionamento, não sofreu alteração significativa.

Além das características químicas próprias das soluções de recondicionamento, o fluxo de perfusão também pode influenciar a formação de edema alveolar e intersticial. A perfusão dos pulmões com as soluções de preservação com um fluxo máximo de aproximadamente 40% do débito cardíaco estimado foi outra modificação introduzida por Cypel et al.[10], o que possibilitou o aumento do tempo total de perfusão do órgão devido à diminuição do edema. A explicação é que o baixo fluxo protege a microvasculatura pulmonar contra a lesão mecânica do endotélio, mantendo a integridade da barreira alvéolo-capilar e evitando, assim, o extravasamento de líquido dos vasos.

A conseqüência desse benefício pode ser verificada diretamente através de parâmetros hemodinâmicos e funcionais, como a resistência vascular e a complacência pulmonar. De fato, a resistência de um vaso é dependente, entre

outros, da intensidade do fluxo que passa por ele. Assim, para este estudo, adotamos o fluxo preconizado por Cypel et al.[10], para garantir a manutenção da pressão da artéria pulmonar entre 10 e 15 mmHg. Com isso, não observamos diferença nos valores da resistência vascular pulmonar entre os grupos tratados com a Steen Solution® e com a solução de fabricação nacional.

A resistência vascular também pode ser influenciada por alterações no diâmetro do vaso, segundo a relação de Poiseuille-Hagen[76]. Por exemplo, uma vasoconstrição pode levar a um aumento da resistência caso o fluxo não seja diminuído proporcionalmente. Ora, é consenso que temperaturas baixas, em geral, causam a contração de um ente material, qualquer que seja o estado físico em que se encontra: sólido, líquido ou gasoso. E ainda, que ocorre o oposto caso tal ente seja submetido a temperaturas mais altas, isto é, sua dilatação. Logo, fica evidente que a hipotermia a que são submetidos os pulmões no momento da perfusão com a solução de preservação, bem como durante o período de isquemia fria, causa uma contração generalizada da microvasculatura pulmonar, o que pode elevar subitamente a resistência vascular, além de favorecer o acúmulo de microêmbolos nos vasos capilares.

A normotermia vem sendo usada no sistema de perfusão ex vivo desde o início de sua idealização por Steen et al.[8] Em condições de normotermia, os vasos se dilatam, favorecendo o fluxo da solução de recondicionamento e a remoção de coágulos e microêmbulos, como também diminuindo a lesão do endotélio e a resistência vascular pulmonar. De fato, foi demonstrado que pulmões mantidos por 12 horas em isquemia fria e perfundidos, a seguir, por mais 12 horas com solução normotérmica tiveram um melhor desempenho

após o transplante em relação aos pulmões mantidos apenas em isquemia fria por 24 horas[77].

A hipotermia também pode estar relacionada com a diminuição da complacência pulmonar, já que o tecido frio se torna rígido e oferece muita resistência à expansão pela insuflação de ar. Por outro lado, o aquecimento gradativo do pulmão pela circulação da solução normotérmica oferece ao tecido pulmonar condições mais próximas da situação fisiológica normal, permitindo o seu enchimento e esvaziamento de maneira mais adequada. Em nosso estudo, a complacência pulmonar foi similar em todos os pulmões após o período de 60 minutos de recondicionamento tanto com a Steen Solution® quanto com a solução nacional, alcançando valores próximos aos relatados em outros estudos que utilizaram a mesma técnica[78].

A normalidade da complacência pulmonar está refletida também nos valores da pressão de vias aéreas registrados ao final do período de reperfusão, já que um dos fatores que podem causar aumento da pressão de vias aéreas é justamente uma diminuição da complacência pulmonar[76]. De fato, todos os pulmões reperfundidos, seja com Steen Solution®, seja com a solução de fabricação nacional, apresentaram valores de pressão de vias aéreas dentro da faixa considerada normal (15 a 25 cmH_2O).

O uso de isquemia fria pode ainda desencadear uma sucessão de eventos que propiciam a ativação de mediadores inflamatórios[15], edema celular[16] e a indução de morte celular, tanto na forma de necrose como na forma de apoptose, ambas associadas a pior função pulmonar após a reperfusão[21,22]. Dois estudos verificaram que a apoptose é tempo dependente,

aumentando após 30, 60 e 120 minutos após o transplante (17%, 22% e 35%, respectivamente). No entanto, não houve alteração no número de células apoptóticas durante o período de isquemia fria de 1 a 5 horas, nem durante a isquemia quente pré-implantação. Além disso, estabeleceram uma correlação positiva entre o tipo de morte celular e a função do enxerto[78,79]. Nossos resultados estão de acordo com esses estudos, já que o número de células apoptóticas foi pequeno e sem diferença significativa entre os tempos estudados.

Por fim, as alterações histológicas do tecido pulmonar são bem caracterizadas no processo de isquemia-reperfusão e fornecem informações importantes sobre o grau de lesão tecidual[80]. Utilizamos um método semiquantitativo já validado[68], no qual 13 parâmetros são avaliados por um patologista quanto à sua intensidade. Considerando o valor máximo de 39 pontos que poderia ser atingido com a somatória dos pontos de cada parâmetro, percebe-se que a lesão pulmonar foi baixa (4 pontos, em média) e se manteve estável ao longo do experimento, o que foi coerente com os parâmetros fisiológicos avaliados. Assim, ambas as soluções foram capazes de manter o tecido pulmonar em condições adequadas para um possível transplante.

7. Conclusão

Os pulmões reperfundidos com a solução de recondicionamento de fabricação nacional apresentaram características morfológicas e funcionais similares aos que foram reperfundidos com a solução STEEN®, apesar do maior edema encontrado no grupo reperfundido com a solução nacional. Desta maneira, esta solução fabricada no Brasil representa uma alternativa viável para o emprego em protocolos de pesquisa, inicialmente, e, futuramente, no emprego clínico da técnica no Brasil.

8. Referências

1. 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. Elsevier Inc.; 2012 Oct;31(10):1073–86.

2. Valapour M, Paulson K, Smith JM, Hertz MI, Skeans M a, Heubner BM, et al. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: lung. Am J Transplant. 2013 Jan;13 Suppl 1:149–77.

3. Kim WR, Stock PG, Smith JM, Heimbach JK, Skeans MA, Edwards EB, et al. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: liver. Am J Transplant. 2013 Jan;13 Suppl 1:73–102.

4. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Lamb KE, Gustafson SK, Samana CJ, et al. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: kidney. Am J Transplant. 2013 Jan;13 Suppl 1:11–46.

5. Pêgo-Fernandes PM, Samano MN, Fiorelli a I, Fernandes LM, Camargo SM, Xavier a M, et al. Recommendations for the use of extended criteria donors in lung transplantation. Transplant Proc. Elsevier Inc.; 2011;43(1):216–9.

6. Ingemansson R, Eyjolfsson A, Mared L, Pierre L, Algotsson L, Ekmehag B, et al. Clinical transplantation of initially rejected donor lungs after reconditioning ex vivo. Ann Thorac Surg. The Society of Thoracic Surgeons; 2009 Jan;87(1):255–60.

7. Steen S, Sjöberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. Lancet. 2001 Mar 17;357(9259):825–9.

8. 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 Jun;83(6):2191–4.

9. Cypel M, Yeung JC, Machuca T, Chen M, Singer LG, Yasufuku K, et al. Experience with the first 50 ex vivo lung perfusions in clinical transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg. The American Association for Thoracic Surgery; 2012 Nov;144(5):1200–6.

10. Cypel M, Yeung JC, Hirayama S, Rubacha M, Fischer S, Anraku M, et al. Technique for prolonged normothermic ex vivo lung perfusion. J Heart Lung Transplant. International Society for Heart and Lung Transplantation; 2008 Dec;27(12):1319–25.

11. Martins S, de Perrot M, Imai Y, Yamane M, Quadri SM, Segall L, et al. Transbronchial administration of adenoviral-mediated interleukin-10 gene to the donor improves function in a pig lung transplant model. Gene Ther. 2004 Dec;11(24):1786–96.

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

13. Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, Matthay M a. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Sep 22;106(38):16357–62.

14. Hirayama S, Cypel M, Sato M, Anraku M, Liaw PC, Liu M, et al. Activated protein C in ischemia-reperfusion injury after experimental lung transplantation. J Heart Lung Transplant. Elsevier Inc.; 2009 Nov;28(11):1180–4.

15. Emaminia A, Lapar DJ, Zhao Y, Steidle JF, Harris D a, Laubach VE, et al. Adenosine A□A agonist improves lung function during ex vivo lung perfusion. Ann Thorac Surg. Elsevier Inc.; 2011 Nov;92(5):1840–6.

16. Pêgo-Fernandes PM, Medeiros IL de, Mariani AW, Fernandes FG, Unterpertinger F do V, Samano MN, et al. Ex vivo lung perfusion: initial Brazilian experience. J Bras Pneumol publicação Of da Soc Bras Pneumol e Tisilogia. 2009 Nov;35(11):1107–11.

17. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. Toronto Lung Transplant Group. N Engl J Med. 1986 May 1;314(18):1140–5.

18. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report-2009. J Heart Lung Transplant. Elsevier Inc.; 2009 Oct;28(10):1031–49.

19. Fernandes PMP, Samano MN, Junqueira JJM, Waisberg DR, Noleto GS, Jatene FB. [Lung donor profile in the State of São Paulo, Brazil, in 2006]. J Bras Pneumol publicação Of da Soc Bras Pneumol e Tisilogia. 2008 Jul;34(7):497–505.

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

21. Christie JD, Carby M, Bag R, Corris P, Hertz M, Weill D. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part II:

definition. A consensus statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. J Heart Lung Transplant. 2005 Oct;24(10):1454–9.

22. Arcasoy SM, Fisher A, Hachem RR, Scavuzzo M, Ware LB. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part V: predictors and outcomes. J Heart Lung Transplant. 2005;24(10):1483–8.

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

24. Okada Y, Kondo T. Preservation solution for lung transplantation. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2009 Dec;57(12):635–9.

25. Samano MN, Fernandes LM, Baranauskas JCB, Correia a T, Afonso JE, Teixeira RHOB, et al. Risk factors and survival impact of primary graft dysfunction after lung transplantation in a single institution. Transplant Proc. Elsevier Inc.; 2012 Oct;44(8):2462–8.

26. 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 Oct;24(10):1460–7.

27. Barr ML, Kawut SM, Whelan TP, Girgis R, Böttcher H, Sonett J, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part IV: recipient-related risk factors and markers. J Heart Lung Transplant. 2005;24(10):1468–82.

28. 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 Jan;123(1):98–103.

29. Bando T, Albes JM, Nüsse T, Wada H, Hitomi S, Wahlers T, et al. Comparison of euro-collins solution, low-potassium dextran solution containing glucose, and ET-kyoto solution for lung preservation in an extracorporeal rat lung perfusion model. Eur Surg Res. 1998 Jan;30(5):297–304.

30. 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 Dec;18(12):1198–201.

31. Rabanal JM, Ibañez AM, Mons R, Gonzalez AM, Carbajo M, Ortega J, et al. Influence of preservation solution on early lung function (Euro-Collins vs Perfadex). Transplant Proc. 2003 Aug;35(5):1938–9.

32. Gordon RD, Starzl TE. Changing perspectives on liver transplantation in 1988. Clin Transpl. 1988 Jan;5–27.

33. Dreikorn K, Horsch R, Röhl L. 48- to 96-hour preservation of canine kidneys by initial perfusion and hypothermic storage using the Euro-Collins solution. Eur Urol. 1980 Jan;6(4):221–4.

34. 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 Jan;8(4):207–13.

35. Padilla AM, Padilla JD. [Lung preservation: current practices]. Arch Bronconeumol. 2004 Feb;40(2):86–93.

36. De Perrot M, Keshavjee S. Lung preservation. Semin Thorac Cardiovasc Surg. 2004 Dec;16(4):300–8.

37. 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 Feb;19(1 Pt 2):1334–6.

38. Hausen B, Beuke M, Schroeder F, Poets CF, Hewitt C, DelRossi a J, et al. In vivo measurement of lung preservation solution efficacy: comparison of LPD, UW, EC and low K+-EC following short and extended ischemia. Eur J Cardiothorac Surg. 1997 Nov;12(5):771–9; discussion 779–80.

39. Thabut G, Vinatier I, Brugière O, Lesèche G, Loirat P, Bisson A, et al. Influence of preservation solution on early graft failure in clinical lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Oct 1;164(7):1204–8.

40. Abdefg PD, Acdef EK, Def EA, Df MC, Ad BS, Adef AP, et al. The effectiveness of an extracellular low-potassium solution in 24-hour lung graft preservation. 2006;12(11):355–62.

41. Kelly RF, Murar J, Hong Z, Nelson DP, Hong F, Varghese A, et al. Low potassium dextran lung preservation solution reduces reactive oxygen species production. Ann Thorac Surg. 2003 Jun;75(6):1705–10.

42. Barr ML, Nishanian GP, Sakamaki Y, Carey JN, Chang J, Starnes V a. 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.

43. 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 Mar;121(3):594–6.

44. Nath DS, Walter AR, Johnson AC, Radosevich DM, Prekker ME, Herrington CS, et al. Does Perfadex affect outcomes in clinical lung transplantation? J Heart Lung Transplant. 2005 Dec;24(12):2243–8.

45. Oto T, Griffiths AP, Rosenfeldt F, Levvey BJ, Williams TJ, Snell GI. Early outcomes comparing Perfadex, Euro-Collins, and Papworth solutions in lung transplantation. Ann Thorac Surg. 2006 Nov;82(5):1842–8.

46. Okada Y, Kondo T. Impact of lung preservation solutions, Euro-Collins vs. low-potassium dextran, on early graft function: a review of five clinical studies. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2006 Feb;12(1):10–4.

47. Gámez P, Córdoba M, Millán I, Madrigal L, Alfageme F, Álvarez R, et al. Improvements in Lung Preservation : 3 Years ' Experience With a Low-Potassium Dextran Solution. 2005;41(1):24–7.

48. Sakamaki F, Hoffmann H, Müller C, Dienemann H, Messmer K, Schildberg FW. Reduced Lipid Peroxidation and Ischemia-Reperfusion Injury after Lung Transplantation Using Low-Potassium Dextran Solution for Lung Preservation.

49. 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 Jul;26(1):151–7.

50. Wittwer T, Franke UFW, 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 Aug;24(8):1081–90.

51. Wittwer T, Franke U, Fehrenbach A, Meyer D, Sandhaus T, Pfeifer F, et al. Impact of retrograde graft preservation in Perfadex-based experimental lung transplantation. J Surg Res. 2004 Apr;117(2):239–48.

52. Van De Wauwer C, Neyrinck AP, Geudens N, Rega FR, Verleden GM, Verbeken E, et al. Retrograde flush following topical cooling is superior to preserve the non-heart-beating donor lung. Eur J Cardiothorac Surg. 2007 Jun;31(6):1125–32; discussion 1132–3.

53. Venuta F, Rendina EA, Bufi M, Della Rocca G, De Giacomo T, Costa MG, et al. Preimplantation retrograde pneumoplegia in clinical lung transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg. 1999 Jul;118(1):107–14.

54. Sarsam MA, Yonan NA, Deiraniya AK, Rahman AN. Retrograde pulmonaryplegia for lung preservation in clinical transplantation: a new technique. J Heart Lung Transplant. 12(3):494–8.

55. LoCicero J, Massad M, Matano J, Greene R, Dunn M, Michaelis LL. Contribution of the bronchial circulation to lung preservation. J Thorac Cardiovasc Surg. 1991 May;101(5):807–14; discussion 814–5.

56. Ferraro P, Martin J, Dery J, Prenovault J, Samson L, Coutu M, et al. Late retrograde perfusion of donor lungs does not decrease the severity of primary graft dysfunction. Ann Thorac Surg. 2008 Oct;86(4):1123–9.

57. 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 Feb;57(2):450–7.

58. Sasaki M, Muraoka R, Chiba Y, Hiramatu Y. Influence of pulmonary arterial pressure during flushing on lung preservation. Transplantation. 1996 Jan 15;61(1):22–7.

59. Tanaka H, Chiba Y, Sasaki M, Matsukawa S, Muraoka R. Relationship between flushing pressure and nitric oxide production in preserved lungs. Transplantation. 1998 Feb 27;65(4):460–4.

60. Schumann S, Kirschbaum A, Schliessmann SJ, Wagner G, Goebel U, Priebe H-J, et al. Low pulmonary artery flush perfusion pressure combined with high positive end-expiratory pressure reduces oedema formation in isolated porcine lungs. Physiol Meas. 2010 Feb;31(2):261–72.

61. Chiang CH, Wu K, Yu CP, Yan HC, Perng WC, Wu CP. Hypothermia and prostaglandin E(1) produce synergistic attenuation of ischemia-reperfusion lung injury. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Oct;160(4):1319–23.

62. Wang LS, Nakamoto K, Hsieh CM, Miyoshi S, Cooper JD. Influence of temperature of flushing solution on lung preservation. Ann Thorac Surg. 1993 Mar;55(3):711–5.

63. 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 Jul;112(1):85–93.

64. DeCampos KN, Keshavjee S, Liu M, Slutsky AS. Optimal inflation volume for hypothermic preservation of rat lungs. J Heart Lung Transplant. 1998 Jun;17(6):599–607.

65. Patel MR, Laubach VE, Tribble CG, Kron IL. Hyperinflation during lung preservation and increased reperfusion injury. J Surg Res. 2005 Jan;123(1):134–8.

66. Kao SJ, Wang D, Yeh DY, Hsu K, Hsu YH, Chen HI. Static inflation attenuates ischemia/reperfusion injury in an isolated rat lung in situ. Chest. 2004 Aug;126(2):552–8.

67. Steen S, Liao Q, Wierup PN, Bolys R, Pierre L, Sjöberg T. Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment ex vivo. Ann Thorac Surg. 2003 Jul;76(1):244–52; discussion 252.

68. Medeiros IL, Pêgo-Fernandes PM, Mariani AW, Fernandes FG, Do Vale Unterpertinger F, Canzian M, et al. Histologic and functional evaluation of lungs reconditioned by ex vivo lung perfusion. J Heart Lung Transplant. Elsevier Inc.; 2012;31(3):305–9.

69. Medeiros I, Pego-Fernandes P, Mariani A, Fernandes F, Unterpertinger F, Canzian M, et al. Comparison of lung preservation solutions in human lungs using an ex vivo lung perfusion experimental model. Clinics. 2012;67(9):1101–6.

70. Yeung JC, Cypel M, Waddell TK, van Raemdonck D, Keshavjee S. Update on donor assessment, resuscitation, and acceptance criteria, including novel techniques--non-heart-beating donor lung retrieval and ex vivo donor lung perfusion. Thorac Surg Clin. Elsevier Ltd; 2009 May;19(2):261–74.

71. Wierup P, Haraldsson A, Nilsson F, Pierre L, Scherstén H, Silverborn M, et al. Ex vivo evaluation of nonacceptable donor lungs. Ann Thorac Surg. 2006 Feb;81(2):460–6.

72. Pêgo-Fernandes PM, Mariani AW, Medeiros IL De, Pereira AEDA, Fernandes FG, Valle Unterpertinger F Do, et al. Ex vivo lung evaluation and reconditioning. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2010;25(4):441–6.

73. Pêgo-Fernandes PM, de Medeiros IL, Mariani a W, Fernandes FG, Unterpertinger FD V, Samano MN, et al. Ex vivo lung perfusion: early report of Brazilian experience. Transplant Proc. Elsevier Inc.; 2010 Mar;42(2):440–3.

74. Aigner C, Seebacher G, Klepetko W. Donor selection. Chest Surg Clin N Am. 2003;13:429–42.

75. Egan TM, Haithcock J a, Nicotra W a, Koukoulis G, Inokawa H, Sevala M, et al. Ex vivo evaluation of human lungs for transplant suitability. Ann Thorac Surg. 2006 Apr;81(4):1205–13.

76. Barret KE, Barman SM, Boitano S BH. Fisiologia Médica de Ganong. 24ª ed. Artmed; 2013.

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

78. Fischer S, Cassivi SD, Xavier a M, Cardella J a, 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 Mar;231(3):424–31.

79. Fischer S, Maclean a a, Liu M, Cardella J a, Slutsky a S, Suga M, et al. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med. 2000 Nov;162(5):1932–9.

80. De Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Feb 15;167(4):490–511.