# Natalia Aparecida Nepomuceno da Silva

Avaliação *ex vivo* de pulmões de ratos submetidos ao choque hemorrágico: reposição volêmica com Solução Hipertônica x Solução Salina.

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

Programa de: Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Dr. Marcos Naoyuki Samano

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Natalia Aparecida Nepomuceno da

Avaliação *ex vivo* de pulmões de ratos submetidos ao choque hemorrágico : reposição volêmica com Solução Hipertônica x Solução Salina / Natalia Aparecida Nepomuceno da Silva. --São Paulo, 2015.

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular. Orientador: Marcos Naoyuki Samano.

Descritores:1.Transplante de pulmão 2.Doadores de tecidos 3.Choque hemorrágico 4.Solução salina hipertônica 5.Perfusão 6.Modelos animais

USP/FM/DBD-408/15



Aos meus pais, Sérgio e Claudinete que abriram mão dos seus sonhos para que seus filhos alcançassem seus objetivos. Muito Obrigada pela dedicação, carinho e apoio durante toda jornada, sem o apoio de vocês nada disso seria possível. Devo a vocês esta conquista. Muito Obrigada

Ao meu irmão Daniel, obrigada por você existir. Agradeço a Deus por ter enviado um anjo em minha vida. Seus sonhos também são os meus. Muito obrigada pela força e apoio durante esta fase.

Ao meu amado marido Rodrigo, não tenho palavras para agradecer o quão importante foi seu apoio nesta árdua etapa. Obrigada pelas noites mal dormidas, quando surgia um novo desafio. Esta tese também é sua.

Amo vocês!



A Deus que sempre me deu força para superar cada obstáculo.

Aos meus pais pelo ensinamento, paciência e dedicação. Digo com orgulho que vocês "me ensinaram a pescar e nunca me deram o peixe pronto".

Obrigada pelo carinho e amor, sem isso eu não chegaria até aqui.

Ao meu irmão Daniel pelo apoio fundamental. Obrigada por sempre acreditar em mim.

Ao meu amado marido Rodrigo, meu confidente, obrigada pela paciência e pelo incentivo de sempre fazer tudo cada vez melhor.

Ao meu avô, Tios, Tias, primos e primas e toda família Sana e Nepomuceno por serem muito carinhosos e sempre apoiando o meu caminho.

Ao meu orientador Dr. Marcos Naoyuki Samano, obrigada pelo aprendizado.

Agradeço pela oportunidade, pelos conselhos e apoio. Muito Obrigada

A minha amiga e parceira de trabalho Karina Andrighetti, muito obrigada pela ajuda, com protocolo experimental e com as orientações brilhantes.

Sempre digo que você é um exemplo de pessoa. Quando "crescer" quero ser igual a você.

A amiga Liliane parceira de trabalho e sala, muito obrigada pela ajuda com os experimentos, desculpa pelos banhos de sangue, que são inevitáveis em nossa carreira. Sua parceira e amizade são de fundamental importância. Ao Professor Paulo Manuel Pêgo Fernandes, obrigada por acreditar que merecia a vaga de biologista no laboratório. Obrigada pela oportunidade de realizar este doutorado no Laboratório de Investigação Médica LIM 61.

Ao amigo Aristides, obrigada pela análise estatística, e por me trazer a FMUSP pela primeira vez, que me possibilitou começar a minha primeira iniciação científica no LIM 61.

Aos funcionários da Divisão experimental, Nelsinho, Nice, Richard e Anne obrigada pelas conversas no café da manhã, pelo apoio e disposição em ajudar.

Aos funcionários do Biotério, Dario, Vicente, Suelen, Hugo, Roberto, Pedro e Bruna obrigada pela dedicação em cuidar dos nossos ratos.

Aos funcionários Tatiana, Monica, Suely, Anderson, Eduardo, Sonia, Roseli e Márcia, pelo apoio e possibilitarem infraestrutura para o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos da pós graduação Laura, Sâmia, Rafael, Ari, Thales, Lucas, Gustavo e Arteiro, pelas conversas e sugestões durante todas as aulas.

As queridas Neusa, Juliana, Tatiane e Mônica do Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular, obrigada pela ajuda com todos os formulários.

Muito Obrigada!

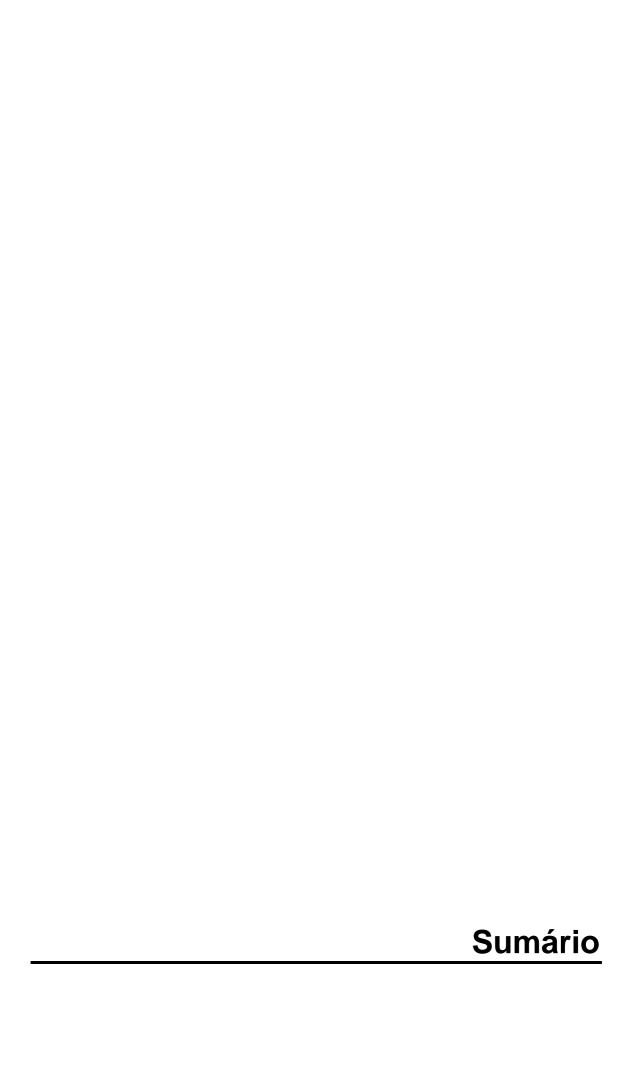


Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical JournalsEditors (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 Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com Lista of Journals Indexed in Index Medicus.



#### LISTA DE ABREVIATURAS SÍMBOLOS E SIGLAS LISTA DE FIGURAS LISTA DE GRÁFICOS LISTA DE TABELAS INTRODUÇÃO...... 01 1 2 2.1 Objetivo principal..... 2.2 Objetivo secundário...... 06 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.......07 3 3.1 Transplante...... 08 3.2 3.3 Disponibilidade de órgãos para doação...... 10 Choque hemorrágico...... 12 3.4 3.5 Recondicionamento pulmonar ex vivo...... 14 3.6 3.7 4 4.1 Delineamento do estudo..... 26 4.2 4.3 Modelode choque hemorrágico..... 29 4.4 Extração pulmonar..... 31 4.5 4.6 4.7 4.8 4.9 Perfusão pulmonar *ex vivo.....* 34 4.9.1 Preparação do perfusato..... 34 4.9.2 4.10 Análise estatística..... 39 Análise estatística descritiva..... 4.10.1 39 4.10.2 5 5.1 5.2 Volume de sangramento...... 41 5.3 Infusão de volume..... 41 5.4

Análise histológica, imunoistoquímica e razão peso úmido e

5.5

	seco	43
5.5.1	Análise histológica – HE	43
5.5.2	Imunoistoquímica- ELISA	46
5.5.2.1	Dosagem de TNF- α	46
5.5.2.2	Dosagem de IL-1β	47
5.5.2.3	Dosagem de IL-6	47
5.5.3	Razão peso úmido-peso seco	48
5.6	Perfusão pulmonar <i>ex vivo</i> - avaliação funcional e mecânica ventilatória	49
5.6.1	Volume corrente	
5.6.2	Pressão de artéria pulmonar	51
5.6.3	Complacência pulmonar	53
5.6.4	Resistência pulmonar	55
5.6.5	Capacidaderelativa de oxigenação	56
5.7	Razão peso úmido-peso seco	57
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÕES	71
8	ANEXOS	73
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

TNF- $\alpha$  – Fator alfa de necrose tumoral

IL1β – Interleucina 1 beta

IL6 - Interleucina 6

RBT - Registro Brasileiro de Transplante

ABTO – Associação Brasileira de Transplante de Órgão

IL-10 - Interleucina 10

IL-17 - Interleucina 17

LPD - Low Porassium Dextran

LIM - Laboratório de investigação Médica

PE-10 - Polietileno 10

PE-50 - Polietileno 50

PAM - Pressão Arterial Média

ELISA -Enzyme linked immuno sorbent assay

PBS – Phosphat e buffered saline

HE- Hematoxilina e eosina

CRO - Capacidade Relativa de Oxigenação

pmp - por milhão de população mmHg -milímetro de mercúrio

Tabela 1	Tabela com média e erro padrão do peso dos animais nos	
	diferentes grupos	74
Tabela 2	Tabela com média e erro padrão do volume de sangramento	
	dos animais submetidos ao choque hemorrágico	74
Tabela 3	Tabela com média e erro padrão do volume de infusão da	
	solução de tratamento dos animais	75
Tabela 4	Tabela com média e erro padrão da pressão arterial média	
	em mmHg dos animais	75
Tabela 5	Tabela com média e erro padrão da quantificação de infiltrado	
	neutrofílico nos grupos de estudo	76
Tabela 6	Tabela com média e erro padrão com dosagem de TNF-α nos	
	diferentes grupos	76
Tabela 7	Tabela com média e erro padrão com dosagem de IL1-β nos	
	diferentes grupos	77
Tabela 8	Tabela com média e erro padrão com dosagem de IL6 nos	
	diferentes grupos	77
Tabela 9	Tabela com média e erro padrão do peso úmido-peso seco in	
	vivo dos grupos	78
Tabela 10	Tabela com média e erro padrão do volume corrente dos	
	pulmões no sistema de perfusão <i>ex vivo</i> dos grupos	78
Tabela 11	Tabela com média e erro padrão de pressão da artéria	
	pulmonar nos pulmões com avaliação no sistema de	79
	perfusão <i>ex vivo</i> dos grupos	19
Tabela 12	Tabela com média e erro padrão da complacência pulmonar	
	nos pulmões com avaliação no sistema de perfusão ex vivo	79
	dos grupos	19
Tabela 13	Tabela com média e erro padrão da resistência pulmonar nos	
	pulmões com avaliação no sistema de perfusão ex vivo dos	οΛ
	grupos	80
Tabela 14	Tabela com média e erro padrão com a capacidade relativa	
	de oxigenação (CRO) nos pulmões com avaliação no sistema	00
	de perfusão ex vivo dos grupos	80

Tabela 15	Tabela com média e erro padrão do peso úmido-peso seco	
	nos pulmões com avaliação no sistema de perfusão exvivo	0.4
	dos grupos	81

Figura 1	Esquematização do protocolo de recondicionamento	17
Figura 2	Esquematização do modelo parabiótico	20
Figura 3	Harvard Apparatus- IL-2 - Isolated Perfused Rat or Guinea Pig Lung System	21
Figura 4	Isolamento da região femoral para canulação da artéria e veia femoral	28
Figura 5	Canulação com tubo de polietileno. Seta: Cateter Tygon	29
Figura 6	Esquematização do procedimento experimental	30
Figura 7	Monitoração do animal durante 120 minutos	31
Figura 8	Ex-vivo Harvard Apparatus IL-2 (Isolated Perfused Rator Guinea Pig Lung System) com sangue dos ratos doadores	35
Figura 9	Preparação do bloco cardiopulmonar. A traquéia foi recanulada em um adaptador para o sistema de ventilação, instalado uma cânula na ventriculotomia esquerda e um fio inabsorvível de algodão no seio transverso para ajuste após a canulação da artéria pulmonar no equipamento de reperfusão ex vivo	36
Figura 10	Sistema de perfusão <i>ex vivo</i> . (A) Fixação do bloco cardiopulmonar no sistema através da canulação da artéria pulmonar pela ventriculotomia direita indicação pela seta vermelha. (B) Bloco cardiopulmonar dentro da câmara de pressão negativa	37
Figura 11	Sistema de aquisição de dados	38
Figura 12	Lâmina de parênquima pulmonar para quantificação do infiltrado neutrofílico. Aumento de 40X. O grupo choque apresentou maior quantificação de neutrófilo. Coloração em Hematoxilina-eosina. A: Choque; B: Sham; C: SS e D: SH	

Gráfico1	Pressão Arterial Média in vivo dos animais. Observamos	
	diferença estatística significante nos grupos submetidos ao	
	choque hemorrágico (Choque, SS e SH) quando comparado	
	ao momento basal (¥ p<0,001). Durante a manutenção do	
	choque hemorrágico há diferença estatística dos grupos	
	Choque, SS e SH quando comparado ao grupo Sham (¤	
	p<0,001). Ao término de 60 minutos o grupo SH igualou-se	
	ao grupo Sham, o grupo SS apresentou diferença estatística	
	significante quando comparado ao grupo Sham (∞ p=0,015).	
	O grupo choque apresenta diferença estatística significante	
	quando comparado aos demais grupos Sham, SS e SH (§	
	p<0,001)	43
Gráfico2	Infiltrado neutrofílico dos grupos. Houve diferença estatística	
	entre os grupos: Choque vs Sham (p<0,001), Choque vs SS	
	(p=0,008) e Choque vs SH ( p<0,001)	44
Gráfico 3	Dosagem de TNF-α entre os grupos. Houve diferença	
	estátistica entre os grupos * Choque vs Sham ( p≤0,001),	46
	Choque vs SS (p<0,001) e Choque vs SH (p≤0,001)	46
Gráfico 4	Dosagem dos níveis IL-1β entre os grupos no macerado	
	pulmonar. Não houve diferença estatística significante entre	47
	os grupos	47
Gráfico 5	Dosagem de IL-6 entre os grupos no macerado pulmonar. A	
	dosagem de IL-6 não mostrou diferença estatística	48
	significante entre os grupos	70
Gráfico 6	Relação peso úmido-peso seco, parâmetro comumente	
	usado para avaliação do edema pulmonar. Há diferença	
	estatística significante entre os grupos Choque vs SS	
	(p=0,041) e Choque vs SH (p=0,013). Não há diferença	
	estatística significante entre o grupo SS, SH vs Sham	49
	(p>0.05)	70
Gráfico 8	Avaliação da mecânica ventilatória ex vivo, volume corrente	
	dos pulmões comparadosentre os grupos. Não observamos	

	diferença estatística significante 50	
Gráfico 9	Avaliação da pressão de artéria pulmonar no sistema de perfusão <i>ex vivo</i> nos diferentes momentos de perfusão. Notase que no momento M10 e M30 há diferença estatística significante entre o grupo Sham vs Choque (*p=0,016) e (¥p=0,004). Nos momentos subsequentes M40, M50 e M60	
	há diferença estatística significante entre os grupos Choque VS Sham; Choque vs SS; Choque vs SH (*	
	p<0,05)	52
Gráfico 10	Avaliação da pressão de artéria pulmonar no sistema de perfusão <i>ex vivo</i> nos grupos. Houve diferença estatística significante entre os grupos. Choque vs Sham (p=0,001), Choque vs SS (p=0,029) e Choque vs SH	
	(p=0,013)	53
Gráfico 11	Avaliação da mecânica ventilatória <i>ex vivo, c</i> omplacência pulmonar nos diferentes momentos de perfusão. Não houve diferença estatística significante nos diferentes momentos	54
Gráfico 12	Avaliação da mecânica ventilatória ex vivo, complacência	<b>0</b> 4
Gráfico 13	pulmonar nos diferentes grupos. Não houve diferença estatística significante entre os grupos	54
	pulmonar nos diferentes momentos de perfusão. Não houve	
	diferença estatística significante nos diferentes momentos	55
Gráfico 14	-	
	pulmonar nos diferentes grupos. Não houve diferença estatística significante entre os grupos	56
Gráfico 15	Capacidade Relativa de Oxigenação nos diferentes	
	momentos de perfusão. Não houve diferença estatística significante nos diferentes momentos	57
Gráfico 16	Capacidade Relativa de Oxigenação nos diferentes grupos.	
	Não houve diferença estatística significante	57

Gráfico 17	Relação peso úmido-peso seco pós perfusão pulmonar ex	
	vivo, parâmetro comumente usado para avaliação do edema	
	pulmonar. Não houve diferença estatística significante entre	
	os grupos	58



Silva NAN. Avaliação ex vivo de pulmões de ratos submetidos ao choque hemorrágico: reposição volêmica com Solução Hipertônica x Solução Salina [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A escassez dos doadores e a má qualidade dos órgãos associados à falta de cuidado em sua manutenção são um grave problema para os grupos de transplante, especialmente para o transplante pulmonar. Um dos principais motivos de recusa para a doação é o edema pulmonar, que pode estar associado a excessiva administração de fluídos no tratamento do choque hemorrágico. Dentre as causa de choque, o choque hemorrágico está frequentemente associado aos doadores vítimas de traumatismo. Uma das estratégias clínicas aplicadas para a recuperação do choque hemorrágico é a administração precoce de fluídos e produtos sanguíneos. O uso de soluções cristalóides como Soluções Isotônicas e Hipertônicas promove a expansão intravascular restabelecendo pressão а arterial ressuscitação volêmica com cristalóide isotônico requer administração de alta quantidade de volume, em contrapartida a solução hipertônica a 7,5% mostra uma redução de três a quatro vezes no volume. Na tentativa de aumentar a oferta de doadores de pulmão nossa hipótese baseia-se na realização de um tratamento com solução Salina Hipertônica em doadores com choque hemorrágico. O objetivo deste trabalho é avaliar pulmões de ratos submetidos ao choque hemorrágico tratados com solução hipertônica comparando com a solução salina. Oitenta ratos foram divididos em 4 grupos: Sham (Sham n=20); Choque (Choque n=20); SS (Choque + Solução Salina n=20) e SH (Choque + Solução Hipertônica n=20). Após anestesia, os animais foram submetidos à cateterização da artéria e veia femoral para registro de pressão arterial média (PAM) e obtenção do choque hemorrágico. No grupo Sham foi realizada a monitorização dos parâmetros, nos grupos Choque, SS e SH obtenção do choque hemorrágico (40 mmHg), e tratamento de solução hipertônica (4 ml/Kg) no grupo SH e solução salina (33 ml/kg) no grupo SS. Após 120 minutos, 10 blocos cardiopulmonares de cada grupo foram encaminhados ao sistema de perfusão ex vivo Harvard Apparatus IL-2 Isolated Perfused e avaliados durante 60 minutos, os outros 10 blocos dos grupo foram destinados a dosagem de citocinaTnf-alfa, IL 1-beta e quantificação de neutrófilo. Na avaliação ex vivo o parâmetro que apresentou diferença estatística significante foi a Pressão da artéria Pulmonar (PAP) do grupo Choque em relação aos demais grupos (p<0.05). A dosagem de Tnf-α no grupo choque foi superior a todos os grupo (p<0,05). Em relação a contagem de neutrófilos o grupo tratado com solução hipertônica e solução isotônica apresentaram resultado igual ao grupo Sham,o grupo choque apresentou infiltrado neutrofílico superior aos demais grupos (p<0.05). Concluímos que os pulmões de ratos submetidos ao choque hemorrágico tratados com solução hipertônica apresentam parâmetros de mecânica ventilatória semelhante e recuperação hemodinâmica melhor do que os animais tratados com solução salina a 0,9%. Além disso, reduz os parâmetros inflamatórios dos animais submetidos ao choque hemorrágico.

Descritores: transplante de pulmão; doadores de tecidos; choque hemorrágico; solução salina hipertônica; perfusão; modelos animais.



Silva NAN. Ex vivo evaluation of lungs of rats subjected to hemorrhagic shock: volume replacement with hypertonic solution x Saline Solution[Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

The lack of donors and poor quality of organs associated to poor organ handling is a serious problem for transplantation groups, especially for lung transplantation. Pulmonary edema is one of the main reasons for donation rejection, which may be associated to excessive fluid administration in the treatment of hemorrhagic shock. Of the causes of shock, hemorrhagic shock is frequently associated to donors who are victims of trauma. One of the clinical strategies used in the recovery of hemorrhagic shock is the early administration of fluids and blood products. The use of crystalloid solutions such as Isotonic and Hypertonic Solutions promote intravascular volume expansion thus reestablishing mean blood pressure. Volume resuscitation with isotonic crystalloid requires the administration of a high amount of volume, whereas hypertonic solution 7.5% produces a three or four fold volume reduction. In an attempt to increase the offer of lung donors, our hypothesis is based on a treatment with hypertonic saline solution in donors with hemorrhagic shock. The objective of this study is to evaluate the lungs of rats undergoing hemorrhagic shock treated with hypertonic solution compared to saline solution. Eighty rats were divided into 4 groups: Sham (Sham, n=20); Shock (Shock, n=20); SS (Shock + Saline Solution, n=20) and SH (Shock + Hypertonic Solution, n=20). After anesthesia, animals were submitted to catheterization of the femoral artery and vein to record mean arterial pressure (MAP) andto obtain hemorrhagic shock. In the Sham group the different parameters were monitored, in the Shock, SS and SH groups hemorrhagic shock was obtained (40 mmHg). The SH group received the hypertonic solution (4 ml/Kg) and the SS group received saline solution (33 ml/kg). After 120 minutes, 10 cardiopulmonary blocks of each group were evaluated by the ex vivo Harvard Apparatus IL-2 Isolated Perfused system for 60 minutes, the other 10 blocks were had cytokine TNFalpha and IL 1-beta measurement and neutrophil quantification performed. In the ex vivo evaluation, pulmonary artery pressure (PAP) was the variable with statistically significant difference (p<0.05) in the shock group when compared to the other groups. TNF-α measurement in the shock group was higher than in all of the other groups (p<0.05). Neutrophil counts in the groups treated with hypertonic solution and isotonic solution were similar to the Sham group. The shock group had higher neutrophil infiltrate values than the other groups (p<0.05). We conclude that the lungs of rats undergoing hemorrhagic shock treated with hypertonic solution had similar mechanical ventilation parameters and better hemodynamic recovery than the animals treated with 0.9% saline solution. Furthermore, it reduced the inflammatory parameters of animals undergoing hemorrhagic shock.

Key-words: Lung transplantation, Tissue donor; Hemorrhagic Shock; Hypertonic Saline Solution; Perfusion; Animal Models.

O transplante pulmonar é um tratamento efetivo para doenças pulmonares graves <sup>1</sup>. Com os avanços tecnológicos, o aprimoramento da técnica cirúrgica e a melhora da preservação, o número de transplantes pulmonares aumentou consideravelmente, atingindo mais de 3715 casos em 2012<sup>2</sup>. Apesar desse aumento, o número de pacientes em lista de espera ainda aumenta significantemente.

As baixas taxas de efetivação do transplante de órgãos sólidos é um fator problemático para a maioria das equipes transplantadoras, principalmente para a equipe do transplante de pulmão, em virtude da suscetibilidade desse órgão a complicações durante manejo do doador <sup>3-5</sup>. A seleção dos doadores é baseada em critérios clínicos como idade, comorbidades, intercorrências na UTI, tempo de intubação orotraqueal, radiografia de tórax e gasometria arterial.<sup>6,7</sup>

Na tentativa de aumentar o número de doadores, estratégias como a extensão dos critérios clínicos de seleção (doadores não-ideais), a doação com coração parado, ou ainda,utilização de pulmões recondicionados, têm sido empregadas. <sup>6,8-11</sup>

A morte encefálica consiste em um processo que envolve uma série de alterações bioquímicas repercutindo efeito deletério nos múltiplos órgãos. Além da deterioração intrínseca que levou ao quadro de morte encefálica, os potenciais doadores de órgãos frequentemente apresentam hipertensão intracraniana, hipovolemia e hemorragia. <sup>12</sup>

Sabe-se que o processo de morte encefálica gera várias alterações sistêmicas, podendo estar associadas a variações hemodinâmicas, metabólicas, neuro-hormonais e fisiológicas. O pulmão é um órgão altamente

vulnerável e o acúmulo de líquido desencadeia o edema, prejudicando a oxigenação. A morte encefálica libera citocinas pro-inflamatórias (TNF-α, IL-1β e IL6) que aumentam o risco de injúria pulmonar na reperfusão do órgão <sup>13,14</sup>.

O choque hemorrágico acomete vítimas de trauma sendo importante causa de mortalidade<sup>15</sup>. Consequente à perda de sangue, o choque hipovolêmico prejudica a perfusão tecidual, pois o volume intracelular torna-se insuficiente para perfusão. Além disso, este trauma hemorrágico induz a uma precoce injúria pulmonar que pode estar associado ao edema devido o aumento da permeabilidade capilar<sup>16</sup>.

O choque hemorrágico prejudica o funcionamento das bombas de íons na membrana celular comprometendo pH, aumentando a disfunção endotelial e estimulando a cascata inflamatória. Esses mecanismos induzidos pelo choque hemorrágico provocam, nas células pulmonares, elevada resposta inflamatória e alto estresse oxidativo. Clinicamente, o choque é classificado em quatro classes, de acordo com a porcentagem de perda do volume: Classe I: déficit de15%; Classe II: déficit de 20 a 25%; Classe III: déficit de 30 a 35% e Classe IV: déficit de 40 a 50%. 17

Uma das estratégias clínicas aplicadas para a recuperação do choque hemorrágico é a administração precoce de fluídos e produtos sanguíneos. O uso de soluções cristalóides como Soluções Isotônicas e Hipertônicas vem sendo utilizada há décadas, sendo considerada um tratamento de primeira escolha. A ressuscitação volêmica com cristalóide isotônico requer administração de alta quantidade de volume. Em contrapartida a solução hipertônica a 7,5% mostra uma redução de três a quatro vezes no volume se comparada a infusão de solução isotônica. 18,19

Protocolos experimentais e clínicos foram extensivamente investigados, a fim de verificar qual fluido proporciona uma melhor recuperação. A solução Hipertônica é caracterizada por alta concentração de sódio. Sua utilização surgiu após alguns estudos publicados em 1980. Em estudo experimental em cães, a infusão da solução hipertônica a 7,5% restabeleceu a pressão arterial média e o débito cardíaco<sup>20</sup>.

Com a infusão de solução hipertônica, mecanismos fisiológicos promovem a expansão volêmica intravascular, devido ao gradiente osmótico proveniente da solução administrada <sup>21</sup>. Além da recuperação da pressão arterial média, a solução hipertônica proporciona efeitos benéficos na circulação, como a vasodilatação e o aumento do fluxo sanguíneo<sup>22</sup>. Embora inúmeros trabalhos encontrados na literatura evidenciem os benefícios de seu uso, esta solução ainda não foi aprovada para uso clínico nos Estados Unidos e no Canadá<sup>23</sup>

Não há na literatura trabalhos relacionados ao tratamento de doadores de múltiplos órgão com choque hemorrágico e tratamento com solução hipertônica. A fim de avaliar os potenciais efeitos benéficos da solução hipertônica sobre os pulmões, propusemos um estudo do uso da solução hipertônica no tratamento do choque hemorrágico em modelo experimental de doador de múltiplos órgãos.

Neste estudo avaliamos a mecânica ventilatória através do sistema *ex vivo* comparando a terapia tradicional de ressuscitação volêmica com uso de solução salina com o tratamento de solução hipertônica.

# 2.1 Objetivo principal

Avaliar funcionalmente os pulmões de ratos em um modelo experimental de doador de múltiplos órgãos submetidos ao choque hemorrágico, tratados com Solução Hipertônica a 7,5% por meio de perfusão ex-vivo, comparando com a Solução Salina 0,9%

.

# 2.2 Objetivo secundário

Avaliar o efeito da ressuscitação volêmica com Solução Hipertônica a 7,5%, na histologia e expressão de mediadores inflamatórios dos pulmões submetidos ao choque hemorrágico.



# 3.1 Transplante

A partir de estudos experimentais em modelo animal no início do século XX, o transplante de órgão sólidos tornou-se uma terapia de rotina. A técnica cirúrgica basea-se nas anastomoses vasculares, descritas pelo cirurgião Alexis Carrel no inicio do século passado, o que lhe proporcionou o Premio Nobel de 1912. O primeiro transplante bem sucedido ocorreu em 1950 e o órgão implantado foi o rim<sup>24</sup>.

Em 1947 o russo Vladimir Demikhov realizou o primeiro tranplante pulmonar canino <sup>25</sup>. O francês Henri Metras em 1950, publicou seus achados com alotransplante pulmonar unilateral em cães. Algumas técnicas desenvolvidas por Metras como a anastomose com "cuff" atrial são utilizadas até os dias atuais. O Dr. James Hardy, da Universidade do Mississipi, realizou o primeiro transplante pulmonar unilateral em humano em 1963. O receptor, paciente masculino de 58 anos, evoluiu com melhora da função pulmonar, até falecer após 18 dias por falência renal. Apesar da curta sobrevida do paciente, o procedimento mostrou-se viável neste momento <sup>26</sup>. Nos anos seguintes, 38 casos de transplantes foram realizados, embora todos tenham apresentado sobrevida curta, seja em decorrência da rejeição aguda , seja por complicações da anastomose brônguica.

O inicio dos anos 1980 foi marcado pelo surgimento da ciclosporina que representou o maior avanço na imunossupressão obtido até então. Em 1983, o Dr. Joel Cooper realizou o primeiro transplante da "era ciclopsorina" em um

paciente com 53 anos e diagnóstico de fibrose pulmonar, que teve sobrevida de 6 anos<sup>27-29</sup>.

### 3.2 Transplante pulmonar no Brasil

O primeiro transplante pulmonar realizado no Brasil foi em 1989 pelo Dr. José de Jesus Peixoto Camargo na Santa Casa de Misericórdia em Porto Alegre<sup>30</sup>. No estado de São Paulo o primeiro transplante pulmonar foi realizado em 1990 no Hospital São Paulo pela equipe do Dr. Vicente Forte, no mesmo ano também foi realizado o primeiro transplante no Incor. Nos últimos anos houve um grande aumento no número de transplantes realizados no país assim como na qualidade dos resultados <sup>31</sup>.

Apesar do pouco crescimento dos programas de transplante na década de noventa o Registro Brasileiro de Transplantes (RBT) demonstra que nos últimos anos houve aumento progressivo no número de transplantes de pulmão. Em 2006 foram realizados 49 transplantes de pulmão, em 2008 um total de 53; em 2010 um total de 61 e em 2012 um total de 69. Atualmente há 6 equipes de transplante pulmonar ativas no país. O Instituto do Coração em São Paulo e a Santa Casa de Misericórdia em Porto Alegre destacam-se como os maiores centros de transplante pulmonar brasileiros<sup>32</sup>.

## 3.3 Disponibilidade de órgãos para doação

Superadas as grandes dificuldades que limitaram o sucesso do transplante até meados dos anos 80, como a complexidade envolvida na técnica cirúrgica e no manejo da imunossupressão pós-operatória, atualmente um dos maiores obstáculos relacionados ao emprego da técnica passou a ser a escassez de órgãos viáveis para o transplante. Como conseqüência, a lista de espera tem crescido mais rapidamente e um número significativo de pacientes morrem na fila. É importante salientar que, além de contribuir com a mortalidade, a demora no atendimento exerce impacto significativo sobre o bem-estar, as probabilidades de cura, a natureza e a extensão das seqüelas nos pacientes.

Segundo o relatório de Dimensionamento dos Transplantes no Brasil, publicado pela Associação Brasileira de Transplantes de Órgão (ABTO), o número de doadores efetivos está em progressão. Em 2005, o número de doadores era de 6,3 pmp, aumentando para 9 pmp em 2009 e para 12,6 pmp em 2012<sup>32</sup>. No entanto esse número ainda é baixo quando comparado à demanda e a mortalidade observada nos registros dos pacientes em lista de espera por órgãos para transplante.

No Estado de São Paulo, apenas 4,9% dos pulmões doados são efetivamente utilizados para transplante<sup>33</sup>. Apesar da oferta de órgãos múltiplos ter dobrado de 2005 a 2012, como relatado anteriormente, quando verificamos os dados sobre a oferta de pulmão isoladamente percebemos que o crescimento foi de apenas 33% durante esse mesmo período <sup>32</sup>.

Ao longo dos anos, a lista de espera para transplante pulmonar no Estado de São Paulo tem apresentado um crescimento progressivo<sup>34</sup> repercutindo, no aumento do tempo de espera médio para a realização do transplante, que nos últimos anos é de 1,8 anos<sup>35</sup>. A mortalidade em lista de espera é de aproximadamente 21% após 1 ano, 24% após 1,5 anos e 37% após 2 anos da inclusão em lista <sup>36</sup>.

Vários fatores podem estar envolvidos na limitação dos números de doadores, sendo os mais freqüentes relativos à recusa familiar e à falta de cooperação por parte das equipes médicas em notificar à central de transplantes sobre a existência de potenciais doadores.

A publicação da portaria GM nº. 1752, de 23 de setembro de 2005, estabeleceu que todos os hospitais com mais de 80 leitos devem ter uma Comissão Intra-Hospitalar de Doação de Órgãos e Tecidos para Transplante, mas apenas 10% dos hospitais que se enquadram nesta categoria têm de fato equipes atuantes. Schirmer et al., revelaram dados alarmantes relativos ao conhecimento dos profissionais de UTI a respeito da legislação sobre doação de órgãos e tecidos. Segundo esses autores, os profissionais (médicos e enfermeiros) têm conhecimento parcial sobre o diagnóstico de morte encefálica, tipo de doação e de sua responsabilidade legal sobre a notificação. Tal cenário contribui para as baixas taxas de notificação.

Outro fator que diminui consideravelmente a disponibilidade de órgãos para o transplante é o fato de que muitas vezes a doação de órgãos está relacionada a acidente trágico ou vítimas de trauma com hipotensão severa. Além disso, a demora em se determinar o diagnóstico de morte encefálica e

após esse evento, a falta de cuidados com o doador, podem in viabilizar o transplante por impactar de maneira negativa a estrutura e função do órgão. No caso dos pulmões, isso é agravado pela sensibilidade deste órgão aos efeitos deletérios da cascata de reações provenientes da morte encefálica e do choque hemorrágico.

### 3.4 Choque hemorrágico

A morte encefálica está associada a uma série de eventos deletérios que leva a uma progressiva deterioração dos diferentes órgãos. Esta deterioração compromete a quantidade, qualidade de órgãos viáveis, além de contribuir para complicações no período após o transplante, elevando as taxas de morbidade e mortalidade<sup>3,38</sup>. Ressaltamos alguns mecanismos como a instabilidade hemodinâmica, a falha endócrina, elevada resposta inflamatória, arritmia, hipotermia e hemorragia que contribuem para este aumento na deterioração dos órgãos<sup>38</sup>.

A hipotensão é um achado freqüente nos doadores e ocorre ao longo do diagnóstico de morte cerebral. A causa desta hipotensão está relacionada a uma série de eventos como dano no centro vasomotor, hipovolemia, disfunção cardíaca e insuficiência endócrina. Estudos com o objetivo de avaliar doadores renais e hepáticos com pressão sistólica entre 80 e 90mmHg observaram um aumento da incidência na falência do enxerto<sup>39,40</sup>.

O choque hemorrágico caracteriza-se por redução significativa do sangue com hipoperfusão tecidual e redução da oferta de oxigênio às células.

Esta redução na oferta de oxigênio gera alterações significativas no metabolismo circulatório promovendo a ativação do metabolismo celular anaeróbico, e alteração na microcirculação. Estas alterações são desencadeadas para promover à oferta de oxigênio para os diferentes órgãos e tecidos<sup>41</sup>. Este mecanismo regulatório pode ser prejudicado em conseqüência da duração do choque hemorrágico bem como pela lesão gerada em pacientes politraumatizados<sup>23</sup>.

A resposta precoce do organismo ao choque hemorrágico prolongado gera uma acentuada ativação do sistema imune com intensa reação inflamatória sistêmica caracterizada por uma liberação maciça de mediadores inflamatórios e migração de células inflamatórias para os tecidos<sup>42,43</sup>.

O acúmulo de neutrófilos é um fator comum em decorrência do choque hemorrágico<sup>42</sup>. O endotélio encontra-se com disfunção orgânica importante comprometendo duas funções de destaque: o controle da permeabilidade vascular e modulação da adesão e migração leucocitária<sup>44</sup>.

A permeabilidade endotelial é prejudicada pelo choque hemorrágico. Este fato deve-se a hipoperfusão prolongada, a ação dos radicais livres e ação dos mediadores inflamatórios presentes na circulação <sup>45</sup>. Além destes fatores, há extravasamento de líquidos e proteínas do meio intravascular para o interstício, facilitando a passagem dos mediadores inflamatórios para o tecido <sup>23</sup>

Sabe-se que o choque hemorrágico induz a uma precoce lesão pulmonar que pode estar associada ao edema pulmonar devido ao aumento da permeabilidade capilar e infiltração de células inflamatórias para o interstício 16,46,47.

Sendo o pulmão um órgão altamente vulnerável, estes mecanismos comprometem a troca gasosa inviabilizando o órgão para doação<sup>14</sup>. Um dos critérios de seleção do doador é a gasometria, baseada em uma relação pO₂ ≥ 300 mmHg, doadores de pulmões que não atingem este valor são considerados limítrofes.

Estratégias para otimizar o uso de doadores limítrofes são utilizadas em diferentes centros transplantadores. Alguns programas convergem para recuperação de doadores com coração parado, no entanto esta estratégia ainda é limitada devido a considerações técnicas, éticas e legais<sup>48,49</sup>. Outros centros aplicam a metodologia de recondicionamento pulmonar capaz de melhorar o pulmão através de uma avaliação durante a perfusão pulmonar *ex vivo*. Há ainda poucos relatos do pré-tratamento nos doadores com infusão de solução hipertônica. Um estudo de 2009 com doador de coração avalia o pré-tratamento com solução hipertônica <sup>50</sup>.

### 3.5 Recondicionamento pulmonar ex vivo

O desenvolvimento de um sistema de perfusão *ex vivo* para pulmões humanos conhecido como recondicionamento pulmonar, vem impactando de maneira positiva na expectativa de aumentar o número de órgão viáveis para o transplante.

O grupo sueco liderado pelo Dr. Stig Steen, no final da década de 1990 desenvolveu o sistema de perfusão *ex vivo* com o intuito de avaliação da funcionalidade do pulmão. O primeiro trabalho experimental em porcos

publicado propôs o desenvolvimento de um circuito mecânico que possibilitava a avaliação dos pulmões em um modelo de doador após parada cardíaca. Neste estudo, o grupo desenvolveu uma solução capaz de controlar a formação de edema e melhorar a função pulmonar. Esta solução ganhou o nome de Steen Solution (Vitrolife; Gothenburg, Suécia)<sup>51</sup>. Com êxito no protocolo experimental em 2000 na Universidade de Lund o Dr. Steen realizou o primeiro transplante pulmonar de um doador com coração parado, após avaliação funcional do órgão e melhora gasométrica dos pulmões pelo sistema ex vivo<sup>49</sup>.

Com o estabelecimento da técnica de perfusão *ex vivo*, um novo conceito começou a ser explorado, não somente a realização da avaliação da função pulmonar, mas também uma possibilidade de recuperação desta função. Desta forma, o uso da perfusão *ex vivo* para avaliação dos doadores limítrofes também despertou interesse de outros grupos para o desenvolvimento da metodologia<sup>52</sup>.

A descoberta da melhora da função pulmonar através da reperfusão *ex vivo* possibilitou a criação do conceito de "Recondicionamento pulmonar"

O primeiro transplante submetido ao recondicionamento pulmonar foi realizado em 2005 na Universidade de Lund. O doador com 19 anos vítima de acidente automobilístico apresentava baixa troca gasosa com PaO<sub>2</sub>67 mmHg sendo motivo de recusa para a doação dos pulmões. Os pulmões foram captados e submetidos ao processo de recondiciomento *ex vivo*. Os pulmões permaneceram no protocolo por uma hora havendo melhora gasométrica significante com PaO<sub>2</sub>391,5 mmHg. Os pulmões foram utilizados em um receptor do sexo masculino com 70 anos e diagnóstico de DPOC (doença

pulmonar obstrutiva crônica) O transplante foi realizado com sucesso<sup>53</sup>.

Pouco tempo depois Steen et al., publicaram em 2009 uma série de seis casos submetidos ao recondicionamento pulmonar apresentando sobrevida de 100% em três meses<sup>54</sup>.

Com a publicação destes achados, vários centros transplantadores demonstraram interesse nesta técnica. Destaca-se o grupo de Toronto liderado pelo Prof<sup>o</sup> Shaf Keshavjee que iniciou o desenvolvimento de protocolos experimentais com a técnica de recondicionamento<sup>9,55</sup>.

Esta equipe estabeleceu algumas modificações do protocolo sueco como o uso de solução Steen acelular, isto é, sem adição de concentrado de hemácias, mudança do fluxo de perfusão para 40% do débito cardíaco e a pressão da artéria pulmonar com variação de 10 a 15 mmHg.

Estas alterações possibilitaram o desenvolvimento e publicação de um protocolo experimental com porcos de perfusão *ex vivo* com 12 horas de duração em perfusão normotérmica<sup>55</sup>. (Figura 1)

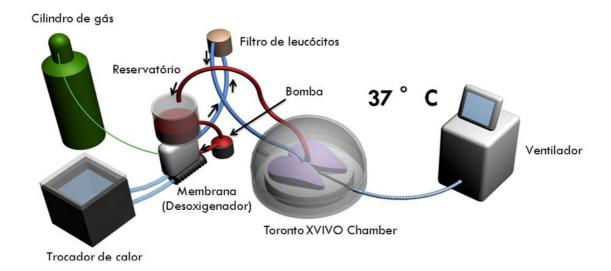


Figura 1- Esquematização do protocolo de recondicionamento. Modificado de Cypel et al 2008.

Após a execução dos protocolos experimentais a equipe apresentou os resultados de um ensaio clínico com 20 pacientes transplantados submetidos ao recondicionamento e avaliação *exvivo*. O ensaio clínico mostrou que a incidência da disfunção primária do enxerto neste grupo foi semelhante aos pacientes transplantados sem o recondicionamento, não houve mortalidade em 30 dias<sup>56,57</sup>. Mais recentemente, nova publicação com 50 transplantes mantém os resultados apresentados previamente <sup>58</sup>.

No Brasil o Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HC/FMUSP) iniciou a experiência com o recondicionamento pulmonar em 2008 período no qual parte da equipe dirigiu-se a Suécia para aprender a técnica do recondicionamento pulmonar. Este iniciativa gerou uma linha de pesquisa e como resultado foi publicada uma série de estudos com a aplicação da técnica de recondicionamento *ex vivo* em modelos experimentais de pulmões humanos<sup>59-</sup>

Atualmente encontra-se em desenvolvimento na instituição um estudo clínico em humanos com a técnica de recondicionamento pulmonar *ex vivo*. Foram realizados até o momento 6 casos de perfusão pulmonar *ex vivo* com execução do transplante de um caso.

Novas propostas com o tratamento dos pulmões durante a perfusão pulmonar *ex vivo* vêm sendo difundida. O uso de um adenovírus como vetor para terapia gênica contendo IL-10 propõem o aumento dessa interleucina com potente ação anti-inflamatória no órgão a ser transplantado<sup>65</sup>.

Estudo recente em rato com geneterapia de IL-10 mostraram a diminuição significativa da citocina IL-17, amenizando a resposta de rejeição do enxerto<sup>66</sup>.

Outra estratégia promissora é o uso inovador na área da medicina regenerativa com uso de órgão bioartificial<sup>67</sup>. Demonstrado por Song et al., a decelularização em modelo experimental com pulmões de ratos doadores, e recelularização através de um sistema de perfusão *ex vivo*, seguido da realização do transplante com sobrevida de sete dias, demostrou não só a viabilidade da técnica como também adequada função pulmonar. Estes achados propulsionam a perspectiva de aplicabilidade na regeneração de pulmões através da arquitetura pulmonar decelularizada, e posterior recelularização com células do receptor diminuindo assim a rejeição<sup>68</sup>.

### 3.6 Modelos animais de avaliação pulmonar ex vivo

Modelos experimentais com animais de grande porte são caros e demandam muito tempo. No passado, estudos experimentais em modelo

canino foram amplamente utilizados para técnica de transplante pulmonar. No entanto, devido ao apelo público o uso de cães foi substituído por outro modelo animal.

Experimentos com animais pequenos possui a vantagem da redução orçamentária, além da possibilidade de execução de um maior número de casos em menor tempo, possibilitando a realização de estudos com diferentes soluções de preservação, técnicas de transplante e outros.

O modelo de transplante pulmonar *in vivo* em ratos é bem descrito na literatura<sup>69,70</sup>. No entanto, devido a dificuldade da técnica de anastomose e mensuração de dados complementares como a resistência vascular a reprodutibilidade da técnica torna-se complexa. Outro fator de destaque são as altas taxas de mortalidade nos centros de pesquisa que desenvolvem o protocolo com baixa freqüência. Por este motivo modelos de perfusão pulmonar isolada *ex vivo* ganharam força.

Diversos protocolos experimentais com a temática de avaliação pulmonar *ex vivo* já foram relatados na literatura. Em um dos primeiros modelos de avaliação pulmonar, pulmões de coelhos foram ventilados e perfundidos com sangue de 3 ou quatro coelhos doadores<sup>71</sup>. Neste modelo não havia a recirculação do sangue, o sangue oxigenado pelos pulmões não retornava ao circuito. O modelo "single-pass" apresenta a limitação do tempo de avaliação, não ultrapassando 10 minutos.

Uma das alternativas para resolução deste problema na recirculação do sangue oxigenado, foi à integração ao sistema de avaliação, um rato previamente anestesiado, com a finalidade de fornecer sangue venoso, isto é

desoxigenar o sangue continuamente no circuito, como demonstrado na Figura 2.

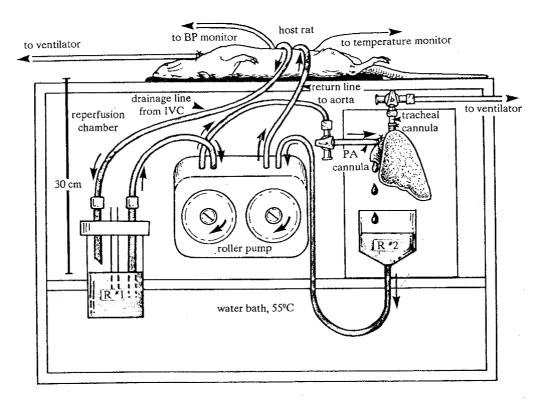


Figura 2- Esquematização do modelo parabiótico. Extraído de: De Campos et al., 1993

Este modelo conhecido como modelo parabiótico possibilitou um maior tempo de perfusão pulmonar. A maior dificuldade desse sistema foi manter a estabilidade do rato anestesiado durante todo o período de desenvolvimento do protocolo <sup>72</sup>. O uso de um modelo parabiótico com coellho também foi descrito por Weder et al<sup>73</sup>.

O surgimento de uma membrana utilizada para "desoxigenação" possibilitou a simplificação dos sistemas de avaliação *ex vivo*, tornando-o mais estável e permitindo maior tempo de perfusão pulmonar.

O modelo de avaliação e perfusão *ex vivo* mais utilizado no momento é comercializado com o nome Harvard Apparatus- IL-2 –Isolated Perfused Rat or Guinea Pig Lung System. Este sistema possibilita a aquisição de dados como parâmetros hemodinâmicos e da mecânica ventilatória em tempo real. (Figura 3)

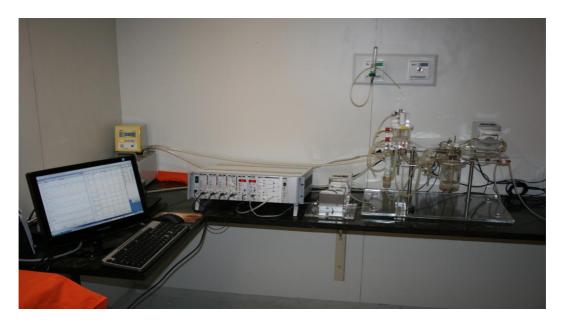


Figura 3- Harvard Apparatus- IL-2 - Isolated Perfused Rat or Guinea Pig Lung System. Extraído de: Arquivo Cirurgia Torácica

Os dados são armazenamento a cada segundo em um computador acoplado. Este sistema foi desenvolvido para diferentes espécies de animais o IL-1 Isolated Perfused Lung é utilizado para camundongo, o IL-4 Isolated Perfused Lung é utilizado para coelhos e o IL-16 Isolated Perfused Lung utilizado para porcos ou outros animais de grande porte.

Este sistema foi adquirido pelo Laboratório de Investigação Médica ( LIM 61) da Disciplina de Cirurgia Torácica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 2009. Iniciou-se uma linha experimental em pequenos animais com importação do sistema de perfusão pulmonar *ex vivo*. Como resultado destas pesquisas uma série de estudos foram publicados com a viabilidade de diferentes soluções de preservação pulmonar em modelo murino. Os primeiros estudos publicados com o uso da máquina de perfusão *ex vivo* descrevem detalhadamente a metodologia utilizada para avaliação pulmonar *ex vivo*<sup>74,75</sup>.

Soares et al compararam o uso da solução Perfadex<sup>®</sup> ( solução padrão utilizada) com Solução LPD nacional (Farmoterápica®). Os resultados demonstraram que a solução LPD nacional apresentou troca gasosa semelhante a solução padrão. No entanto, a solução nacional teve pior resultado em relação a mecânica ventilatória e formação de edema <sup>76</sup>.

Simões et al. avaliaram a solução Custodiol® versus solução Perfadex® em diferentes tempos de isquemia fria verificando similar desempenho durante perfusão e avaliação *ex vivo* entre as duas soluções. Em relação à patologia o estudo mostrou similar quantificação em relação a apoptose e achados patológicos nos grupos Custodiol® versus solução Perfadex®77,78. Menezes et al. compararam a solução Celsior® com a solução padrão Perfadex® em modelo experimental com pulmões de ratos em diferentes tempos isquêmicos demonstrando similar troca gasosa e achados histológicos. Na mecânica ventilatória a resistência pulmonar foi significantemente menor nos pulmões preservados com solução Celsior® quando comparado aos pulmões preservados com solução Perfadex®79. Cardoso et al., avaliaram através do sistema de perfusão *ex vivo* o desempenho funcional dos pulmões submetidos a inalação de prostaciclina versus administração parenteral, demonstrando que

o desempenho hemodinâmico e a troca gasosa dos pulmões tende a superioridade com o uso de prostaciclina<sup>80</sup>.

## 3.7 Solução hipertônica

O interesse terapêutico pelo uso da solução salina hipertônica iniciou em 1917 quando Penfield publicou o estudo com cães mostrando recuperação da hipotensão promovida através da retirada de sangue no animal No Brasil em 1980 estudos experimentais com choque hemorrágico e infusão de baixo volume com solução de cloreto de sódio a 7,5% em modelo canino, foi capaz de recuperar a pressão arterial média inicial após indução de choque hemorrágico<sup>82</sup>.

No mesmo ano, um estudo pioneiro clinico em humano com histórico de choque hemorrágico demonstrou melhora nos parâmetros hemodinâmicos após infusão de solução salina hipertônica a 7,5%83.

Diversos artigos de diferentes grupos confirmam estes achados com a infusão de pequeno volume de NaCl a 7,5% mostrando recuperação dos parâmetros hemodinâmicos após a perda sanguínea de 40-50% 22,84-87.

O mecanismo fisiológico da expansão volêmica envolvido no processo de infusão de solução salina hipertônica deve-se pela composição da solução. A transferência do líquido do compartimento intersticial e intracelular em direção intravascular é promovido pelo alto gradiente osmótico da solução. Este mecanismo produz o ganho de 2,75 mL de plasma a cada 1 mL de solução salina hipertônica infundido, enquanto, a infusão de solução salina isotônica o ganho é de apenas 0,33 mL a cada 1 mL<sup>82</sup>.

Estudos demonstram que a administração de solução hipertônica também promove efeito benéfico na microcirculação. O mecanismo que envolve esta melhora deve-se a o fato do ambiente vascular encontrar-se hipertônico, que resulta no aumento do fluxo nas regiões hipoperfundidas que o choque hemorrágico provocou<sup>19,22</sup>.

Na literatura são escassos trabalhos com a temática de tratamento de doador pulmonar com choque hemorrágico e sua avaliação através do sistema de perfusão *ex vivo*. Um estudo publicado em 2007 compara a administração da solução salina hipertônica associada à hidroxietilamido ou solução isotônica em modelo de choque hemorrágico em porcos, demonstrando que a infusão não atenuou o edema pulmonar promovido pelo choque hemorrágico<sup>88</sup>.

Contraditoriamente ao artigo citado acima, dois estudos com uso da solução hipertônica demonstraram efeito protetor na injúria pulmonar após o modelo de choque hemorrágico em animais<sup>89,90</sup>.

Roch et al<sup>91</sup> observaram os efeitos da solução hipertônica realizada com pré-tratamento na isquemia e reperfusão em modelo experimental em porcos. Eles observaram que o tratamento com hipertônica piorou o edema pulmonar.

Portanto, como se pode observar, não há consenso na literatura sobre os estudos de solução hipertônica em pulmões após o choque hemorrágico

O presente estudo teve a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) e da Diretoria Clínica do HCFMUSP( Protocolo de pesquisa nº 253/10).

Os animais utilizados durante o experimento foram fornecidos pelo biotério da Universidade de Campinas, Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB). Os animais foram mantidos no Biotério da Divisão de Experimentação do Instituto do Coração, em ambiente convencional, água e ração balanceada *ad libitum*. Todo protocolo experimental foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica LIM 61 localizado na Divisão de Experimentação Animal do Instituto do Coração.

#### 4.1 Delineamento do estudo

Foram utilizados 80 ratos machos adultos, *Sprague Dawley* com peso médio de 250 a 350 gramas. O protocolo foi baseado nos princípios éticos segundo as normas vigentes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA que regem sua utilização na pesquisa científica.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente através de sorteio nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo Sham (Sham): 20 animais submetidos à cateterização vascular sem indução do choque ou qualquer tipo de reposição volêmica.
- Grupo Choque (Choque): 20 animais submetidos à cateterização vascular, com indução do choque.

- Grupo SS (Choque + Tratamento Salina): 20 animais submetidos à cateterização vascular, induzidos ao choque, e tratado com 33ml/kg de Solução Salina a 0,9%.
- Grupo SH (Choque + Tratamento Hipertônica): 20 animais submetidos à cateterização vascular, induzidos ao choque, e tratado com 4 ml/kg de Solução Hipertônica 7,5%.

## 4.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50mg/kg), pesados e fixados em prancha de preparação. Procedeu-se com exposição da traquéia cervical, para traqueostomia e inicio da ventilação mecânica em ventilador para pequenos animais (Harvard Apparatus, modelo 683), com volume corrente de 10 ml/kg e freqüência de 80 ciclos por minuto.

Com o animal posicionado na prancha realizou-se a assepsia e tricotomia da região femoral direita e esquerda, procedendo com a dissecção da região direita para o isolamento e canulação da artéria e veia (Figura 2). O cateter foi confeccionado com tubos tipo Tygon (Critchley, Austrália) 4 cm de Polietileno (PE-10) unido com auxílio de uma haste metálica, à 13 cm de Polietileno (PE-50) e preenchido com solução salina e heparina (Figura 4).

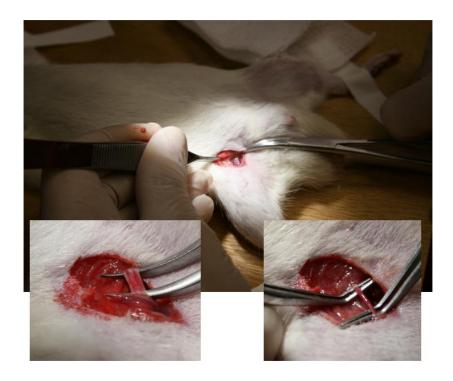


Figura 4 - Isolamento da região femoral para canulação da artéria e veia femoral.

Para a inserção do cateter nas artérias e veia femorais utilizamos um microscópio estereoscópio binocular com aumento de 4.5X (Olympus, modelo SZ6145). O catéter da artéria femoral direita foi conectado a um monitor (Dixtal, DX2021, Brasil) para registro da pressão arterial média (PAM). O cateter da veia femoral direita foi utilizado para a administração do tratamento da Solução Hipertônica (SH) ou Solução Salina (SS) (Figura 5). Posteriormente a região femoral esquerda foi dissecada e a artéria femoral canulada para a indução e manutenção do choque hemorrágico, por meio da retirada de sangue.

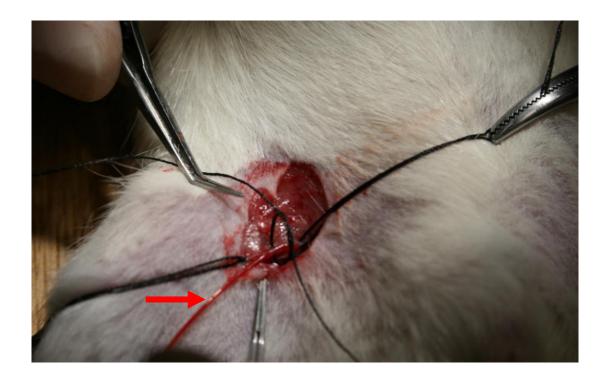


Figura 5 - Canulação com tubo de polietileno. Seta: Cateter Tygon

## 4.3 Modelo de choque hemorrágico

O modelo de choque hemorrágico utilizado foi bem descrito por Vincenzi et al,<sup>23</sup>. Induzimos o choque pela retirada de sangue em alíquotas sucessivas através do catéter posicionado na artéria femoral esquerda, utilizando seringas previamente heparinizadas (Figura 6). A pressão arterial de 40 mmHg foi atingida em 10 minutos. Este nível de choque foi mantido por um período adicional de 50 minutos, pela retirada ou reinfusão do sangue em casos de alteração da PAM (±5 mmHg).

Sangria até 40 mmHg	Manutenção choque PAM 40mmHg (±5mmHg)	Tratamento Soluções Sangue	Registro da PAM após Tratamento
10 min	50 min	20 min	40 min

Figura 6- Esquematização do procedimento experimental.

O grupo Sham e o grupo choque foram monitorados durante todo o período do experimento. Os grupos SS E SH foram submetidos ao tratamento com reposição volêmica após o choque hemorrágico. O grupo SS recebeu a infusão de 33 ml/Kg de Solução Salina a 0,9% em um período de 20 minutos. O grupo SH recebeu a infusão de 4ml/Kg de Solução Hipertônica a 7,5% no período de 5 minutos.

Nos animais submetidos à reposição volêmica (grupo SS e SH), após o término da infusão da solução, realizou-se a reinfusão de metade do sangue retirado. A Pressão arterial média (PAM) foi observada durante os 120 minutos (Figura 7).



Figura 7 - Monitoração do animal durante 120 minutos

Ao término da observação de 120 minutos, procedeu-se com a extração do bloco cardiopulmonar do animal doador.

## 4.4 Extração pulmonar

Uma laparotomia com ressecção do esterno foi realizada e o diafragma foi aberto radialmente com cautela para não lesionar o pulmão. Por meio da timectomia o coração foi exposto, procedendo com ventriculotomia direita adjacente à artéria pulmonar, secção da veia cava inferior e ventrículo esquerdo longitudinalmente na ponta. A perfusão pulmonar anterógrada foi

realizada com a solução de preservação (Perfadex®, Vitrolife Göteborg, Suécia), através de uma cânula introduzida na artéria pulmonar pela ventriculotomia direita. A solução de preservação foi administrada por gravidade a partir de um reservatório posicionado 20 cm acima do coração, com drenagem espontânea do efluente pela ventriculotomia esquerda. Ao término da perfusão, a traquéia foi ligada com um fio abaixo da cânula e a extração pulmonar foi realizada em sentido craniocaudal a partir do estreito cervicomediastinal superior, por tração anterior e inferior da traquéia com dissecção do mediastino posterior.

Do total de 80 animais, 40 pulmões foram destinados para análise patológica em lâminas de HE e imunohistoquímica para dosagem de IL-6, TNF-α e IL1-β através da técnica de ELISA do macerado pulmonar. Utiliza-se o lobo esquerdo para relação peso úmido e seco. O lobo superior e médio utilizou-se para o macerado pulmonar e lobo inferior para análise patológica. Os outros 40 pulmões foram encaminhados para avaliação através do sistema de perfusão ex-vivo (Harvard Apparatus- IL-2).

### 4.5 Preparo do macerado

Os lobos superior e médio do lado direito, foram homogenizados em um mL de PBS (salina tampão fosfato) e centrifugados 4°C a 13000 rpm por 20 minutos. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi aliquotado e armazenado em microtubos de 1,5 ml (Ependorf AG, Hamburg – Alemanha). Os materiais aliquotados foram mantidos a -80°C até o processamento das amostras.

### 4.6 Análise histológica(HE)

Os lobos inferiores direito dos pulmões foram imersos em formalina tamponada a 10% para fixação. Após 24 horas, foram confeccionados blocos de parafina com os fragmentos, os quais foram seccionados em cortes de 5 µm e corados com hematoxilina-eosina. Estas lâminas foram "scaneadas" para leitura no Software Image- Pro Plus. Uma análise semi-quantitativa foi realizada baseada na contagem de neutrófilos, presente no parênquima pulmonar.

### 4.7 Análise imunoistoquímica(ELISA)

Para determinação dos níveis de TNF, IL-1b, IL-6 utilizamos kits comercialmente disponíveis para imunoensaio enzimático, específico para a análise das substâncias citadas em ratos (Quantikine Rat IL-6, Quantikine Rat IL-1β e Quantikine Rat TNF-α, R&D Systems Inc, Minneapolis MN- USA). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

## 4.8 Razão peso úmido-peso seco

Um parâmetro comumente usado para avaliação do edema pulmonar é a razão entre o peso úmido e o peso após secagem em estufa. Para esta medida, separamos o pulmão esquerdo do bloco e o pesamos (peso úmido).

Este era colocado em estufa a 60 °C por 24 horas, e pesado em seguida (peso seco).

## 4.9 Perfusão pulmonar ex vivo

## 4.9.1 Preparação do perfusato

Cerca de 30 minutos antes do inicio da perfusão, três animais foram anestesiados. A veia cava inferior abdominal foi exposta, e sangue homólogo foi obtido por punção em seringas previamente heparinizadas. O sangue foi acrescido de Solução Krebs - Henseleit ( 118 mMNaCl, 4,7 mMKCl,1,2 mM KH2PO4, 1,2 mMMgSO4, 2,5 mMCaCl2, 24,9mM NaHCO3, 2% BSA, 0,1% Glucose e0,3%Hepes) na proporção de 1:1, na quantidade suficiente para obter-se um volume total aproximado de 80 ml com hematócrito entre 20% a 25%, e vertido no reservatório aquecido e recirculado no sistema com baixo fluxo (3 mL/min) por cerca de 15 min (Figura 8). A mistura gasosa (90% N2 e 10% CO2, fluxo de 200-300mL/min) foi administrada continuamente no desoxigenador de membrana com 0,245 m2 de área de contato (Mendisulfone® D150 Hemofilter; Medica S.R.I., Medolla, Itália).

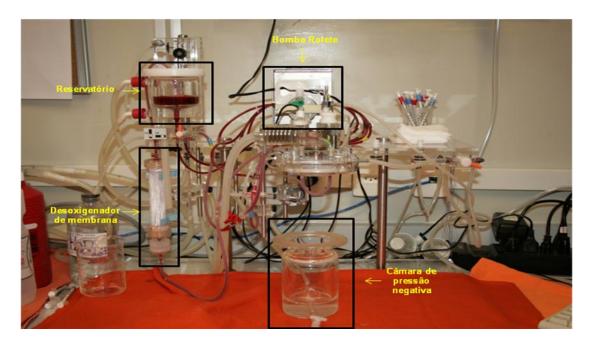


Figura 8- Ex-vivo Harvard Apparatus IL-2 (Isolated Perfused Rat or Guinea Pig Lung System) com sangue dos ratos doadores.

## 4.9.2 Preparação do bloco cardiopulmonar

Simultaneamente ao preparo do circuito *ex-vivo* procedeu-se à preparação do bloco cardiopulmonar, com a recanulação da traquéia com o adaptador para o sistema de ventilação e a instalação da cânula na ventriculotomia esquerda, a qual é posicionada no átrio esquerdo através da válvula mitral e mantida no local por sutura em "U" (nylon 4-0). Um fio inabsorvível (algodão 3-0) foi passado no seio transverso e deixado com nó, sem ajustá-lo. (Figura 9)

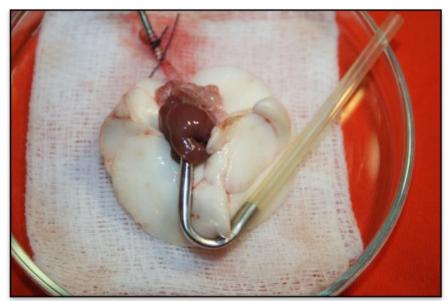
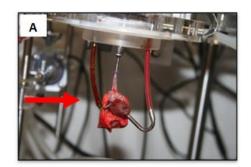


Figura 9- Preparação do bloco cardiopulmonar. A traquéia foi recanulada em um adaptador para o sistema de ventilação, instalado uma cânula na ventriculotomia esquerda e um fio inabsorvível de algodão no seio transverso para ajuste após a canulação da artéria pulmonar no equipamento de reperfusão *ex vivo*.

O bloco foi levado até o sistema de perfusão Harvard Apparatus- IL-2, a cânula traqueal foi fixada iniciando a ventilação na pressão positiva. A cânula da artéria pulmonar foi preenchida com sangue, procedendo com a canulação da artéria pulmonar pela ventriculotomia direita. Com o auxilio de um fio previamente passado pelo seio transverso, fixa-se a cânula na artéria ao mesmo tempo em que oclui a aorta ascendente. (figura 10 A e B)



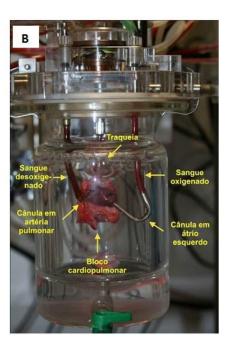


Figura 10- Sistema de perfusão *ex vivo*. (A) Fixação do bloco cardiopulmonar no sistema através da canulação da artéria pulmonar pela ventriculotomia direita indicação pela seta vermelha. (B) Bloco cardiopulmonar dentro da câmara de pressão negativa

Nesse momento, a câmara de pressão negativa foi fechada, e a ventilação por pressão negativa iniciada com cerca de 25% do volume corrente, com FR de 60 ciclos/min, relação inspiração/expiração de 60% e um suspiro/min com 50% de acréscimo do volume corrente. O volume corrente foi aumentado lentamente ao longo de 10 min ate atingir 10mL/Kg de peso corporal. Concomitantemente, iniciou-se a perfusão com fluxo baixo (2mL/min), progredindo-se lentamente ao longo de 10 minutos até atingir o fluxo desejado (5-7mL/min). Isso tem como objetivo a minimização da lesão de reperfusão causada na vasculatura pelo estresse mecânico imposto pelo alto fluxo na fase inicial.

Uma vez estabilizadas a ventilação e a perfusão, iniciou-se a coleta de dados a cada 10 minutos durante os 60 minutos seguintes (M10, M20, M30, M40, M50, M60). Durante a perfusão pulmonar foram coletadas amostras de sangue (0,3 mL) pelas cânulas arterial pulmonar e atrial esquerda para gasometria, ao mesmo tempo que o sistema fornecia os dados de mecânica ventilatória e de hemodinâmica (volume corrente, fluxo aéreo pulmonar, pressão pleural máxima e mínima, complacência, resistência, condutância, pressão da artéria pulmonar) (Figura 11)

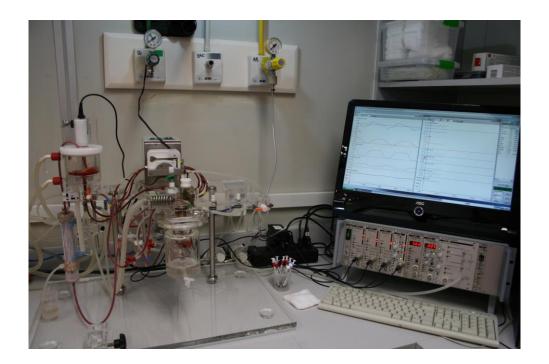


Figura 11- Sistema de aquisição de dados.

Ao final dos 60 minutos da perfusão pulmonar *ex vivo* o lobo esquerdo foi encaminhado para a razão peso úmido e seco.

#### 4.10 Análise estatística

#### 4.10.1 Análise estatística descritiva

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

#### 4.10.2 Análise estatística inferencial

Para análise de dois fatores (Grupo e Tempo), foi utilizada ANOVA de duplo fator de medidas repetidas para um único fator (Tempo). Quando foi necessário realizar comparações múltiplas de médias, nós utilizamos o teste de Bonferroni. O Teste Anova One Way foi utilizado para avaliar as variáveis (sangue retirado, infiltrado neutrofílico, Tnf-α, IL1-β e IL-6). Utilizamos o teste T de Student para comparar as médias dos grupos Solução Hipertônica e Solução Salina em relação ao volume infundido.

Foi considerada uma probabilidade de erro do tipo I ( $\alpha$ ) de 0,05 em todas as análises inferenciais. As análises estatísticas descritivas e inferenciais foram executadas com o software SPSS versão 13 (SPSS 13.0 for Windows).



Os resultados estão representados em gráficos de média e erro padrão.

### 5.1 Peso dos animais

Não houve diferença estatística significante entre o peso médio dos animais nos quatro grupos (p=0,285). O valor médio, expresso em gramas (g) e erro padrão  $\pm$  dos animais nos grupos foram: 324,90 $\pm$  16,46 no grupo Sham, 350,15  $\pm$  14,25 no grupo Choque, 365,10  $\pm$  15,18 no grupo SS e 358,30  $\pm$  15,83 no grupo SH.

## 5.2 Volume de sangramento

O volume de sangue retirado para indução do choque hemorrágico não apresentou diferença estatística significante entre os grupos submetidos ao procedimento (p=0,253). O volume médio, expresso em mililitros (mL) e erro padrão  $\pm$  do sangue retirado dos animais nos grupos foram: 7,40  $\pm$  0,30 no grupo Choque, 6,94  $\pm$  0,36 no grupo SS e 6,67  $\pm$  0,25 no grupo SH.

### 5.3 Infusão de volume

Devido a metodologia utilizada a infusão de volume foi significantemente maior nos animais do grupo SS com tratamento de Solução Salina ( média de 12,11 ± 0,49 mL) em relação ao grupo SH 7,5% ( média 1,43 ± 0,06 mL).(p<0,001)

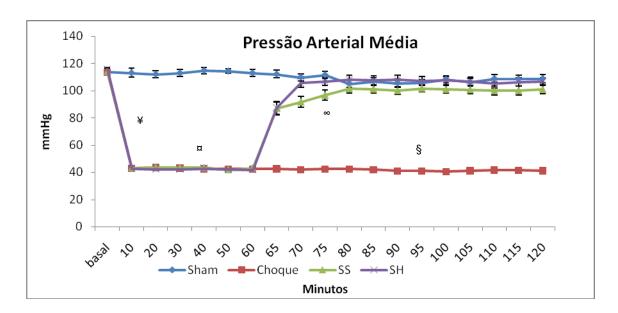
#### 5.4 Pressão arterial média

Os valores médios da pressão arterial média (PAM) no inicio do experimento (momento basal) não apresentaram diferença estatística significante entre os grupos. (p>0,05) O grupo Sham manteve os valores de PAM constantes durante todo o período de monitoração, observando pequenas oscilações ao longo do experimento durante 120 minutos.

Os grupos induzidos ao choque hemorrágico (Choque; SS e SH) apresentaram queda dos valores de PAM como já esperado, com diferença estatística significante (p<0,001) quando comparado ao momento basal no inicio do experimento. Durante a observação e manutenção do choque hemorrágico, os grupos Choque, SS e SH apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo Sham (p<0,001).

Ao término da manutenção do choque hemorrágico e após a infusão de volume nos grupos com reposição volêmica, o grupo SH igualou-se ao grupo Sham não apresentando diferença estatística significante (p>0,05). O grupo SS apresentou diferença estatística significante quando comparado ao grupo Sham (p=0,015). O grupo choque manteve seu níveis pressóricos na média de 42 mmHg apresentando diferença estatística significante (p<0,001) quando comparado aos grupos Sham, SS e SH. Em relação aos diferentes períodos de avaliação, observamos diferença estatística significante no momento 65 minutos entre os grupos Sham vs SS (p<0,001); Sham vs SH (p<0,001). No momento 70 minutos e 75 minutos observamos diferença estatística significante em relação ao grupo SS VS Sham (p<0,001) (Gráfico 1).

Gráfico 1Pressão Arterial Média *in vivo* dos animais. Observamos diferença estatística significante nos grupos submetidos ao choque hemorrágico (Choque, SS e SH) quando comparado ao momento basal (¥ p<0,001). Durante a manutenção do choque hemorrágico há diferença estatística dos grupos Choque, SS e SH quando comparado ao grupo Sham (¤ p<0,001). Ao término de 60 minutos o grupo SH igualou-se ao grupo Sham, o grupo SS apresentou diferença estatística significante quando comparado ao grupo Sham (∞ p=0,015). O grupo choque apresenta diferença estatística significante quando comparado aos demais grupos Sham, SS e SH (§ p<0,001).

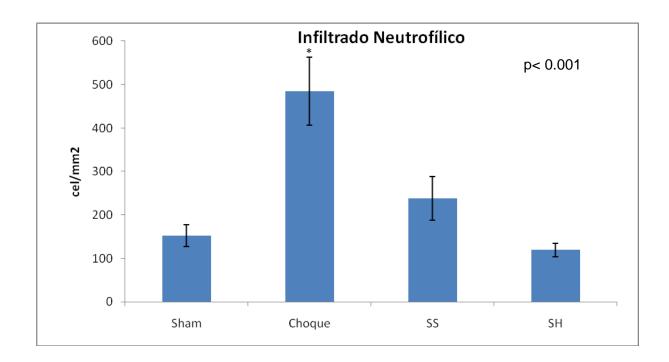


# 5.5 Análise histológica, imunoistoquímica e razão peso úmido e seco

### 5.5.1 Análise histológica – HE

Em relação a quantificação de neutrófilos houve diferença estatística significante entre os grupos (p<0,001). O grupo Choque apresentou maior quantidade de neutrófilos com 485,13 cel/mm2 quando comparado com os demais grupos. Choque vs Sham (p<0,001), Choque vs SS (p=0,008) e Choque vs SH (p<0,001). (Gráfico 2)

Gráfico 2- Infiltrado neutrofílico dos grupos. Houve diferença estatística entre os grupos: Choque vs Sham (p<0,001), Choque vs SS (p=0,008) e Choque vs SH (p<0,001).



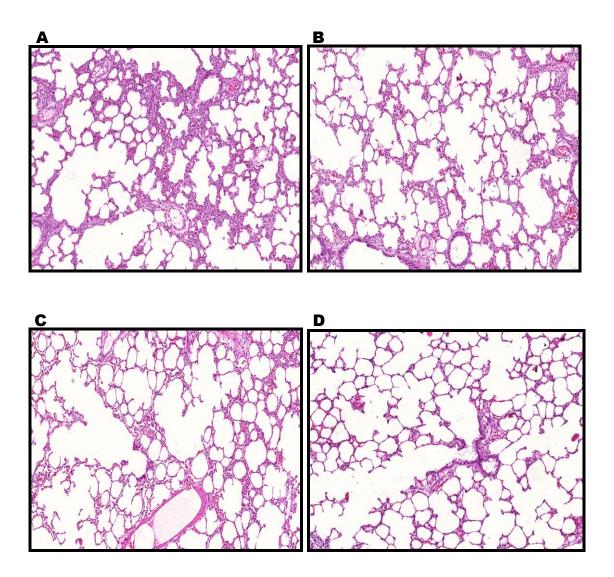


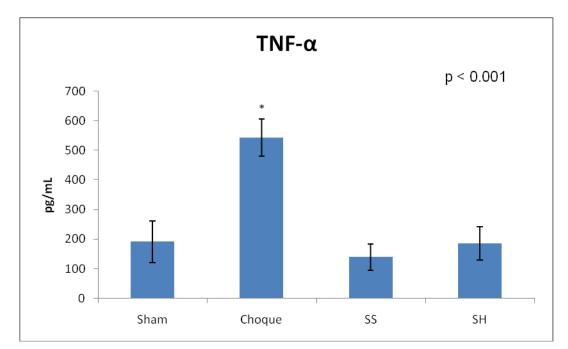
Figura 12- Lâmina de parênquima pulmonar para quantificação do infiltrado neutrofílico. Aumento de 40X. O grupo choque apresentou maior quantificação de neutrófilo. Coloração em Hematoxilina-eosina. A: Choque; B: Sham; C: SS e D: SH.

## 5.5.2 Imunoistoquímica- ELISA

## 5.5.2.1 Dosagem de TNF-α

Houve diferença estatística entre os grupos com p<0,001. O grupo Choque apresentou maiores níveis de TNF- $\alpha$  com dosagem de 543,41 pg/mL quando comparado com os demais grupos. Choque vs Sham ( p≤0,001), Choque vs SS (p<0,001) e Choque vs SH (p≤0,001). (Grafico 3)

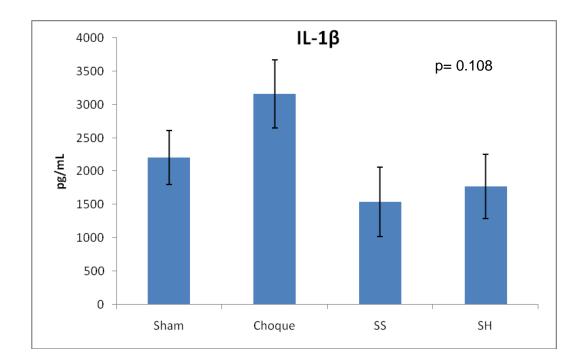
Gráfico 3- Dosagem de TNF- $\alpha$  entre os grupos. Houve diferença estátistica entre os grupos \* Choque vs Sham ( p≤0,001), Choque vs SS (p<0,001) e Choque vs SH (p≤0,001).



### 5.5.2.2 Dosagem de IL-1B

Em relação a quantificação sérica dos níveis de IL-1β no tecido pulmonar dos grupos não houve diferença estatística (p=0,108). (Gráfico 4)

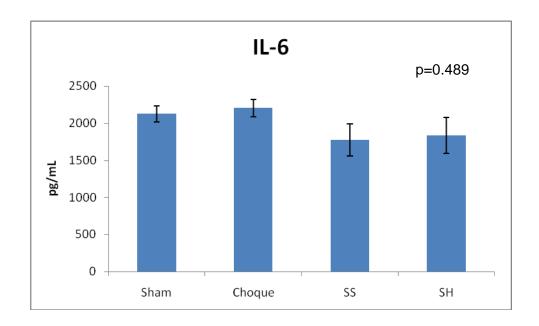
Gráfico 4- Dosagem dos níveis IL-1β entre os grupos no macerado pulmonar. Não houve diferença estatística significante entre os grupos.



### 5.6.2.3Dosagem de IL-6

A dosagem da citocina IL-6 no macerado pulmonar não apresentou diferença estatística entre os grupos com p=0,210 (Gráfico 5)

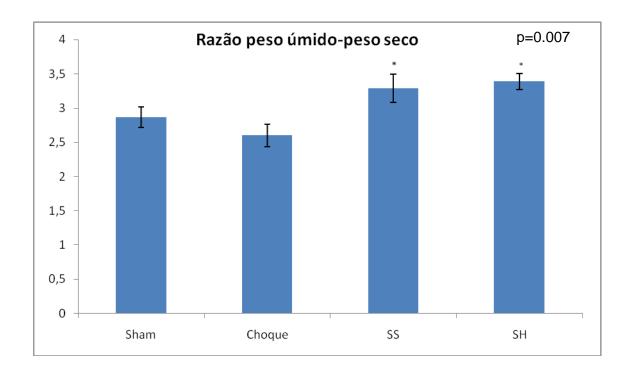
Gráfico 5- Dosagem de IL-6 entre os grupos no macerado pulmonar. A dosagem de IL-6 não mostrou diferença estatística significante entre os grupos.



### 5.5.3 Razão peso úmido-peso seco

Na análise de variância dos grupos houve diferença estatística significante (p=0,007). O grupo Choque apresentou diferença estatística significante quando comparado aos grupos SS e SH , Choque *vs* SS (p=0,041) e Choque *vs* SH (p=0,013). Não houve diferença estatística significante entre os grupos Sham; SS e SH (p>0,05). (Gráfico 6)

Gráfico 6- Relação peso úmido-peso seco, parâmetro comumente usado para avaliação do edema pulmonar. Há diferença estatística significante entre os grupos Choque vs SS (p=0,041) e Choque vs SH (p=0,013). Não há diferença estatística significante entre o grupo SS, SH vs Sham (p>0.05)



# 5.6 Perfusão pulmonar *ex vivo* - avaliação funcional e mecânica ventilatória

#### 5.6.1 Volume corrente

O volume corrente dos pulmões nos grupos experimentais não apresentou diferença estatística significante entre os diferentes momentos nem entre os grupos (Gráfico 7 e 8 ). A média do volume corrente (mL) e erro

padrão nos grupos foram: Sham 1,70  $\pm$  0,29, grupo choque 1,80  $\pm$  0,24, grupo SS 1,85  $\pm$  0,26 e grupo SH 1,70  $\pm$  0,30 (p>0,05)

Gráfico 7- Avaliação da mecânica ventilatória *ex vivo*, volume corrente dos pulmões comparadosentre os grupos nos diferentes momentos. Não observamos diferença estatística significante.

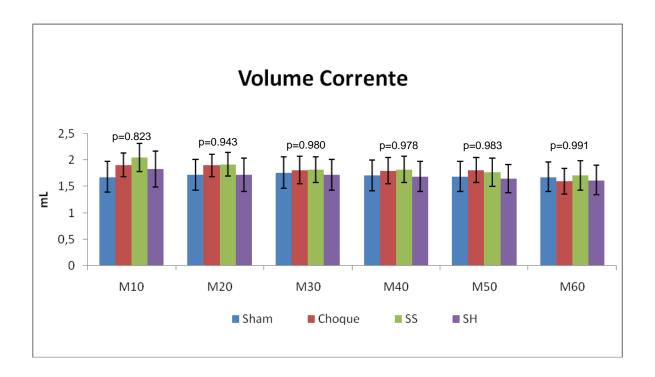
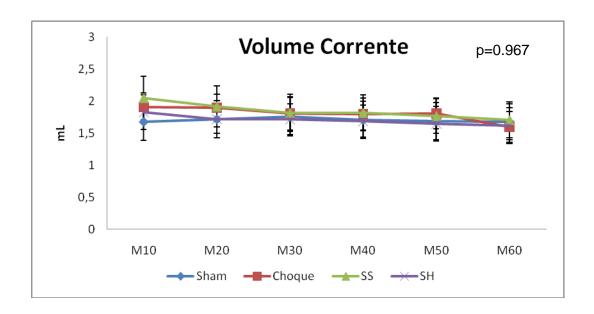


Grafico 8- Avaliação da mecânica ventilatória ex vivo, volume corrente dos pulmões comparadosentre os grupos. Não observamos diferença estatística significante.

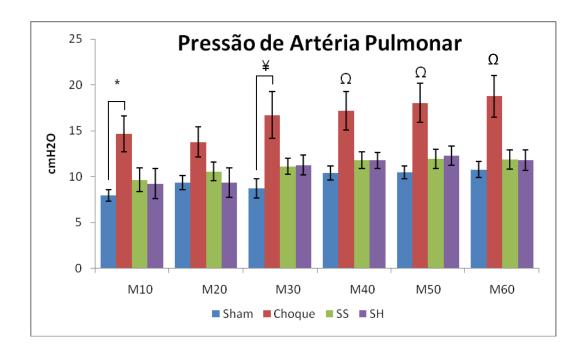


### 5.6.2 Pressão de artéria pulmonar

Os valores pressóricos de artéria pulmonar apresentaram diferença estatística significante nos momentos M10 (p=0,016) M30 (p=0,006), M40 (p=0,003), M50 (p=0,002) e M60 ( p=0,001). (Gráfico 9)

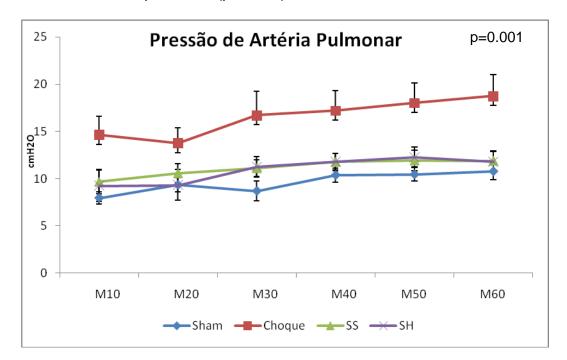
No momento M10 observa-se diferença estatística entre o grupo Sham vs Choque com p=0,016. No momento M30 observa diferença estatística entre os grupos Choque vs Sham com p= 0,004, No momento M40 a diferença estatística é observada entre os grupos Choque vs Sham ( p=0,003), Choque vs SS( p=0,038) e Choque vs SH( p=0,025). No momento M50 a diferença estatística significante foi observada entre os grupos Choque vs Sham ( p=0,002), Choque vs SS ( p=0,023) e Choque vs SH( p=0,024). No último momento M60 os grupos com diferença estatística foram Choque vs Sham ( p=0,002), Choque vs SS ( p=0,015) e Choque vs SH( p=0,028). (Gráfico 9)

Gráfico 9- Avaliação da pressão de artéria pulmonar no sistema de perfusão ex vivo nos diferentes momentos de perfusão. Nota-se que no momento M10 e M30 há diferença estatística significante entre o grupo Shamvs Choque (\*p=0,016) e (¥p=0,004). Nos momentos subsequentes M40, M50 e M60 há diferença estatística significante entre os grupos Choque VS Sham; Choque vs SS; Choque vs SH (\* p<0,05).



Em relação aos grupos observa diferença estatística significante com p=0,001. A diferença estatística é entre os grupos Choque vs Sham ( p=0,001), Choque vs SS (p=0,029) e Choque vs SH( p=0,013). (Grafico 10)

Gráfico 10- Avaliação da pressão de artéria pulmonar no sistema de perfusão *ex vivo* nos grupos. Houve diferença estatística significante entre os grupos. Choque VS Sham (p=0,001), Choque vs SS (p=0,029) e Choque vs SH (p=0,013).



#### 5.6.3 Complacência pulmonar

Em relação ao parâmetro da complacência pulmonar, não houve diferença estatística significante nos diferentes momentos nem entre os grupos (Gráfico 11 e 12). O valor médio e erro padrão da complacência pulmonar (mL/cm $H_2O$ ) nos grupos foram: Sham 0,15  $\pm$  0,02, grupo choque 0,13 $\pm$  0,02, grupo SS 0,16  $\pm$  0,02 e grupo SH 0,14  $\pm$  0,03.

Gráfico 11- Avaliação da mecânica ventilatória *ex vivo, c*omplacência pulmonar nos diferentes momentos de perfusão. Não houve diferença estatística significante nos diferentes momentos.

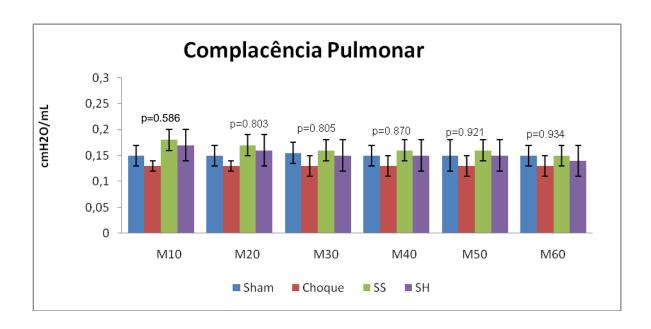
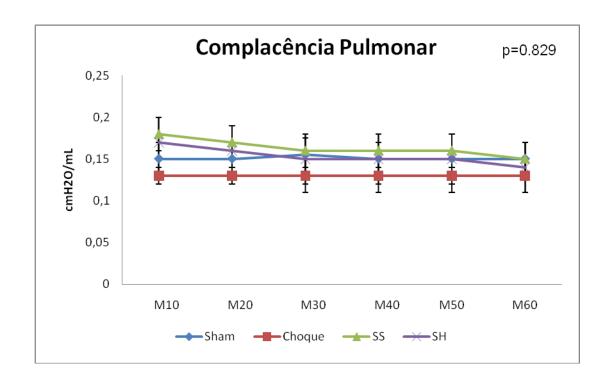


Gráfico 12- Avaliação da mecânica ventilatória *ex vivo, c*omplacência pulmonar nos diferentes grupos. Não houve diferença estatística significante entre os grupos.



#### 5.6.4 Resistência pulmonar

A resistência pulmonar não apresentou diferença estatística significante entre os diferentes momentos nem entre os grupos (Gráfico 13 e 14). O valor médio e erro padrão da resistência pulmonar (cm $H_2O/mL$ ) nos grupos foram: Sham  $0.35 \pm 0.04$ , grupo choque  $0.43 \pm 0.03$ , grupo SS  $0.34 \pm 0.02$  e grupo SH  $0.36 \pm 0.03$ .

Gráfico 13-Avaliação da mecânica ventilatória ex vivo, resistência pulmonar nos diferentes momentos de perfusão. Não houve diferença estatística significante nos diferentes momentos

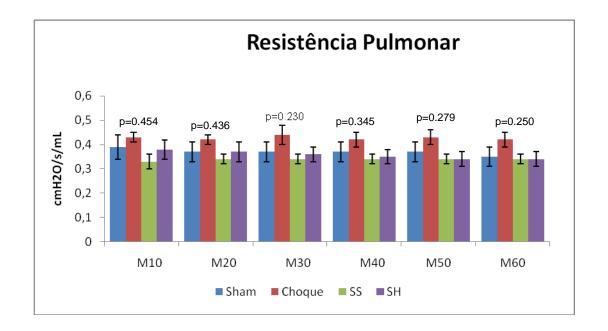
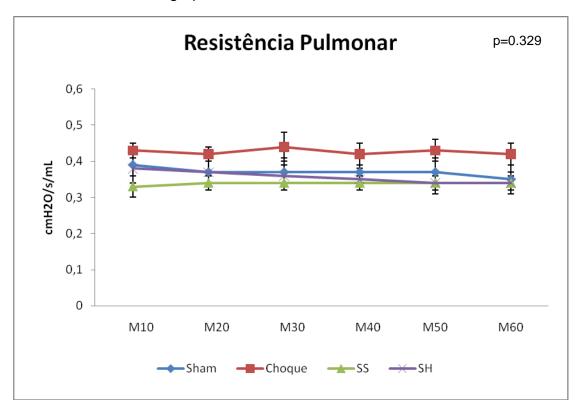


Gráfico 14-Avaliação da mecânica ventilatória ex vivo, resistência pulmonar nos diferentes grupos. Não houve diferença estatística significante entre os grupos.



#### 5.6.5 Capacidade relativa de oxigenação

A Capacidade Relativa de Oxigenação (CRO) é calculada pela fórmula CRO =  $[paO_2 - pvO_2] \times 100/pvO_2$ , dos dados gasométricos coletados ao longo da perfusão pulmonar. A CRO não apresentou diferença estatística significante nos diferentes momentos nem entre os grupos (Gráfico 15 e 16). O valor médio e erro padrão da CRO nos grupos foram: Sham 26,90  $\pm$  5,7, Choque  $12,6 \pm 5,9$ , SS  $20,14 \pm 7,34$  e SH  $18,94 \pm 5,99$ .

Gráfico 15- Capacidade Relativa de Oxigenação nos diferentes momentos de perfusão. Não houve diferença estatística significante nos diferentes momentos.

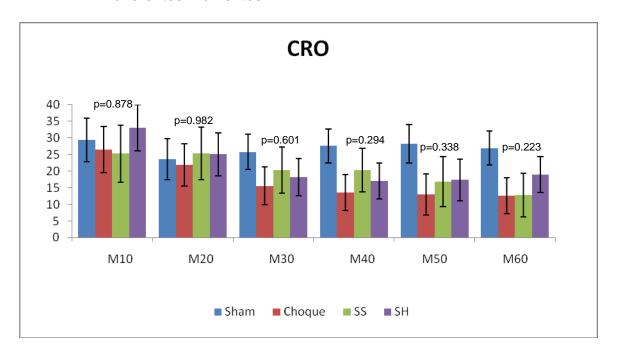
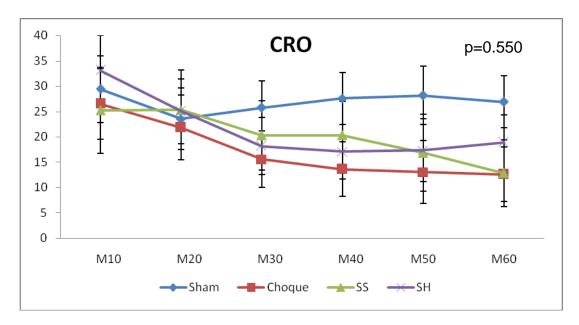


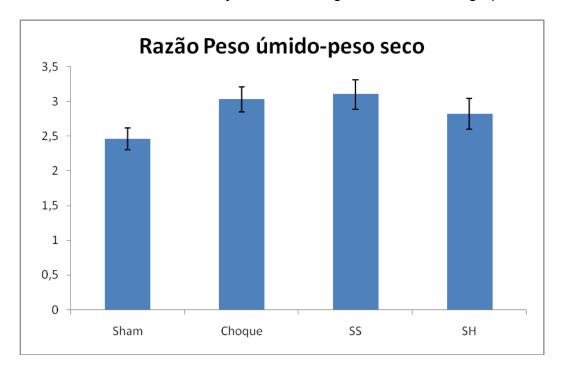
Gráfico 16- Capacidade Relativa de Oxigenação nos diferentes grupos. Não houve diferença estatística significante.



### 5.7 Razão peso úmido-peso seco

A razão peso úmido-peso seco não apresentou diferença estatística significante entre os grupos após a avaliação da perfusão pulmonar com p=0,112 (Gráfico 17). O valor médio e o erro padrão dos grupos da razão peso úmido-peso seco foram: Sham 2,46  $\pm$  0,16, Choque 3,03  $\pm$  0,18, SS 3,10  $\pm$  0,21 e SH 2,82  $\pm$  0,22

Gráfico 17- Relação peso úmido-peso seco pós perfusão pulmonar *ex vivo*, parâmetro comumente usado para avaliação do edema pulmonar. Não houve diferença estatística significante entre os grupos



A grande dificuldade das unidades transplantadoras na atualidade é a escassez de órgãos viáveis ao transplante. Sabe-se que apenas 4,9% dos pulmões doados são aceitos para transplante em nosso meio. Com isso o problema mais visível que as unidades transplantadoras de pulmão vêm enfrentando é o acentuado crescimento das filas de espera. Além da recusa que algumas famílias têm à doação, outros motivos têm sensível impacto no deficitário número de transplantes realizados. Um deles é a falta de comunicação entre as unidades de saúde e serviços de captação; outro que diz respeito mais diretamente a este trabalho, é o diagnóstico tardio da morte encefálica com a infusão de volume não controlado para estabilização dos padrões hemodinâmicos do doador, comprometendo a qualidade deste órgão.

Alternativas no intuito de aumentar a oferta de órgãos viáveis vem sendo desenvolvidas. O uso da técnica de recondicionamento *ex vivo* de pulmões de doadores limítrofes, que é reprodutível, já atingiu 50 casos de pulmões recondicionados e transplantados no maior centro que desenvolve esta prática<sup>58</sup>. Contudo, para o desenvolvimento dessa metodologia, é necessário uma equipe especializada, além do alto custo por procedimento. Uma outra alternativa é o tratamento do doador antes da extração do bloco pulmonar. Técnicas como recrutamento pulmonar no ventilador podem melhorar os padrões ventilatórios tornando-os viáveis para a doação.

A hipotensão é um achado frequente em doadores de múltiplos órgãos, que em sua maioria são vítimas de traumatismo com consequente choque hemorrágico. O choque hemorrágico promove uma lesão pulmonar desencadeando aumento na resposta inflamatória<sup>92</sup>. A ressuscitação com grandes volumes de solução salina é um dos tratamentos para o

restabelecimento dos padrões hemodinâmicos alterado pelo choque hemorrágico, no entanto o pulmão é um órgão altamente vulnerável a infusão de grande quantidade de fluído<sup>93,94</sup>. Tratar o choque hemorrágico adequadamente, sem a infusão de grandes volumes, evitando a hipervolemia e conseqüente edema pulmonar é um dos pilares fundamentais para aumentar a oferta de pulmões.

Os modelos experimentais de choque hemorrágico controlado consistem na retirada do volume sanguíneo em determinado período de tempo, observando constantemente a pressão arterial média monitorada. Em nosso estudo utilizamos o modelo de choque hemorrágico controlado consagrado na literatura <sup>23,96</sup>. O modelo murino utilizado no desenho experimental apresenta volemia de 5,4 mL/100g de peso. A escolha do modelo animal murino deve-se a maior disponibilidade do modelo por serem de pequeno porte e menos dispendiosos para execução por experimento. A seleção da espécie *Sprague-dawley* deve-se a achados na literatura que descreveram alergia de ratos da linhagem Wistar ao componente dextran, presente na solução de preservação Perfadex® utilizada durante o procedimento <sup>95,96</sup>.

Para obtenção do choque hemorrágico retiram-se alíquotas sucessivas de sangue até a PAM atingir a 60 mmHg nos primeiros cinco minutos de experimento, atingindo este valor, os cinco minutos restantes consistem na retirada da volemia para obtenção da PAM em 40 mmHg, totalizando dez minutos.

No nosso estudo, após retirada de alíquotas sucessivas de sangue, o volume total retirado correspondeu a 60% da volemia basal de cada animal. Hirano et al., acharam resultados semelhantes em estudo no qual avaliaram o

modelo experimental de choque hemorrágico com ratos da linhagem Wistar, obtendo o volume de sangramento total de 60% da volemia para a manutenção do choque hemorrágico <sup>97</sup>.

Entre as opções de acessos vasculares, optamos pela dissecção e canulação da região femoral esquerda e direita. Essa escolha deve-se à preocupação em evitar eventuais acidentes – como a ruptura na região de tração entre o cateter e o fio – já que é constante a manipulação do animal. Além disso, Yang et al<sup>98</sup>., demonstraram que a canulação da artéria femoral é melhor que a canulação da artéria carótida no modelo de choque hemorrágico, pois os animais do estudo com canulação da artéria carótida apresentaram maior probabilidade de dano cerebral por inadequada perfusão.

Em nosso desenho experimental, após realização do choque hemorrágico, ocorre a infusão de volume para a recuperação do níveis pressóricos. Optamos pela administração da solução salina a 0,9% e a solução hipertônica a 7,5% para a recuperação da PAM pós-choque hemorrágico. Diversos trabalhos apresentam como possibilidade a utilização da solução Ringer Lactato no mesmo volume da solução salina (por se tratar também de uma solução isotônica) na recuperação do choque hemorrágico. No entanto, optamos pela solução salina a 0,9% por ser atual conduta das equipes médicas no atendimento a vítimas de acidentes. O volume de solução salina 0,9% foi de 33 ml/kg o mesmo utilizado em diversos protocolos experimentais que administram solução Ringer Lactato. Fernandes et al<sup>100</sup>., utilizam volume semelhante de 34 mL/kg de solução salina 0,9% em modelo experimental de choque hemorrágico em rato.

A utilização de soluções isotônicas convencionais para o

restabelecimento da volemia requer quantidade elevada em longo intervalo de tempo. Na prática clínica, em especial no período transoperatório, essa conduta torna-se inviável, pois é comum que a infusão de grandes volumes deva ocorrer com rapidez.

A infusão de pequenas doses de solução hipertônica a 7,5% em modelo experimental de choque hemorrágico com recuperação dos padrões hemodinâmicos mostrou eficiência desde 1980: Velasco et al<sup>82</sup>., constataram que pequenas doses desta solução são tão eficientes quanto maiores volumes de solução isotônica. O volume de solução hipertônica a 7,5% foi de 4ml/kg, que é o volume preconizado para uso clínico, bem como foi descrito no trabalho de Roch e colaboradores <sup>91</sup>. Em nosso estudo também evidenciamos a recuperação do padrão hemodinâmico no grupo com pequena infusão de volume de solução hipertônica.

Entre os estudos experimentais que comparam alto volume de soluções isotônicas com baixo volume de soluções hipertônicas, os resultados referentes aos dados hemodinâmicos de pressão arterial mostram restauração da pressão similar entre os grupos. Estudos experimentais em ratos demonstraram que, após o tratamento do choque hemorrágico, os níveis pressóricos do grupo hipertônica a 7,5% e do grupo solução salina a 0,9% não apresentaram diferença estatística significante, mantendo a pressão em 95,5 mmHg no grupo solução salina 0,9% e 104,5 mmHg no grupo hipertônica a 7,5%99. Em nosso estudo observamos valores pressóricos semelhantes ao descrito anteriormente, com valor de 98,50 mmHg para o grupo com reposição volêmica de solução salina a 0,9% e 105,24 no grupo com reposição de solução salina hipertônica a 7,5%. Watters et al., 100 compararam o tratamento de solução salina 0,9%, solução hipertônica 3% e solução hipertônica a 7,5% com adição de dextran no modelo de choque hemorrágico em suíno. Seus resultados hemodinâmicos mostraram que a solução salina foi significativamente inferior quando comparado aos demais grupos. Este estudo, no entanto administrou volume fixo de 8 mL/Kg independente da solução de tratamento. No nosso estudo as duas soluções foram efetivas na restauração da pressão arterial. No entanto a recuperação do grupo submetido à infusão de volume com solução salina a 0,9% não atingiu os valores pressóricos normais tão rapidamente como os animais tratados com Solução Hipertônica.

As variações de pressão arterial média entre os grupos, observadas nos 15 minutos subsequentes ao inicio da reposição volêmica, são produto da diferença "Volume vs. Tempo de Infusão", dado que no mesmo espaço de tempo deve-se infundir volemia diferente nos grupos hipertônica e salina isotônica. A partir dos 80 minutos, a infusão de volume é finalizada e a pressão arterial média aumenta progressivamente. O mesmo evento também é observado por Vicenzi et al.,<sup>23</sup> que descartaram a comparação entre os grupos nos 15 minutos iniciais do tratamento de choque hemorrágico devido ao modelo metodológico de infusão da solução de tratamento.

Em nosso estudo optamos pela infusão de metade do sangue retirado após a indução do choque hemorrágico. Em estudo piloto, avaliando choque hemorrágico em ratos, o mesmo procedimento foi realizado, verificando que metade do sangue retirado era suficiente para manutenção do níveis de hemoglobina em 10g/dL<sup>23</sup>. Alguns autores optam pela reinfusão de todo o sangue retirado após a indução do choque hemorrágico<sup>101,102</sup>.

A quantificação do infiltrado neutrofílico apresentou diferença

estatisticamente significante entre os grupos. O grupo choque apresentou o maior valor com 485,13 cel/mm². Os grupos com reposição volêmica após a indução do choque hemorrágico apresentaram valor similar ao grupo Sham. Em estudo experimental com choque hemorrágico controlado, tal achado não foi observado, tendo o grupo com tratamento de Ringer Lactato²³ (solução isotônica) obtido o maior score para o parâmetro de infiltrado neutrofílico. Estudo recente com o objetivo de analisar o grau de lesão em pulmões de ratos induzidos ao choque hemorrágico e recuperação volêmica com a infusão de volume em velocidades diferentes mostrou que o grupo submetido à rápida infusão de volume teve infiltrado de células com classificação moderada no entanto sem diferença estatística significante entre os grupos <sup>103</sup>.

Com relação a dosagem dos níveis de citocinas TNF-α, IL-6 e IL1-β nossos resultados mostraram que o grupo choque apresentou o maior concentração da citocina TNF-α diferindo dos demais grupos. Os grupos (SS e SH) com tratamento após choque hemorrágico apresentaram valor semelhante ao grupo Sham. Nydam et al., <sup>104</sup> verificaram em seu estudo que a infusão de solução hipertônica reduz significantemente a concentração de TNF-α, sugerindo que a solução pode atenuar a ativação no receptor, a fosforilação da proteína, ativação transcricional e a tradução do mensageiro.

Gurfinkel et al., 105 mostraram em seu estudo que os animais tratados com solução hipertônica apresentaram maior oxigenação, menor valor de TNF-α e menor valor da IL-6. Os achados de Gurfinkel diferem do nosso estudo, pois o autor apresenta diferença estatística significante entre o grupo tratado com solução salina e o grupo com infusão de solução salina hipertônica em relação aos níveis de citocina TNF-α e interleucina 6. Em nosso estudo a IL-6

não foi diferente entre os grupos. Um fator que pode estar associado a este achado pode ser a utilização so sangue venoso para determinação da concentração das citocinas, em nosso estudo optamos pelo macerado pulmonar Além disso, Gurfinkel desenvolveu seu estudo baseada em um tempo maior de choque hemorrágico, 180 minutos, que pode corroborar para a expressão maior de citocinas.

Ao analisarmos o índice de edema representado pela relação peso úmido e peso seco (U/S) nos animais sem avaliação da perfusão pulmonar *ex vivo*, observamos que os grupos que receberam o tratamento após o choque hemorrágico não apresentaram diferença estatística significante quando comparado ao grupo Sham, mostrando que não houve mais edema pulmonar nos grupos com o tratamento. A mesma metodologia para a análise do índice de edema pulmonar foi utilizada em estudo experimental com camundongos <sup>106</sup>.

Após as avaliações *in vivo* discutidas acima, utilizamos o modelo de perfusão pulmonar *ex vivo* IL-2 – Isolated Perfused Rat or Guinea Pig Lung System, (Harvard Apparatus, Holliston-Massachussets, USA; Hugo Sachs Elektronik, Alemanha) para avaliação do pulmão em condições de reperfusão com sangue de animais da mesma linhagem, simulando assim, a reperfusão pulmonar após o implante no receptor. Nesse caso, a vantagem da reperfusão no sistema "IL-2" é a aquisição dos dados de mecânica e função pulmonar fornecidos pelo sistema o que não seria viável através do transplante propriamente dito. Não há relato na literatura sobre tratamento de doador de pulmão com choque hemorrágico e avaliação pulmonar *ex vivo*.

Apesar da complexidade técnica envolvida para a execução dos experimentos, o protocolo é exequível e o Laboratório de Pesquisa em Cirurgia

Torácica- LIM 61 tem desenvolvido inúmeros estudos nesta linha de pesquisa, com ênfase na área de preservação e recondicionamento de órgãos para transplante. Estudos com avaliação pulmonar ex vivo utilizam hemácia bovina durante a perfusão. Nossa opção foi a de utilizar sangue homólogo de ratos para doação de sangue. Para o preenchimento do sistema são necessários 80 mL de perfusato. Caso o perfusato fosse apenas com sangue de doadores homólogos, seriam necessários sete animais por experimento ou seja, um animal sujeito do estudo e seis animais doadores de sangue. Esta situação poderia incorrer questionamentos éticos no ponto de vista do número total de animais empregados no estudo. Optamos pela diluição do sangue homólogo em solução Krebs-Henseleit na proporção 1:1, produzindo uma solução adequada para perfusão pulmonar, utilizando 3 ratos doadores de sangue.

A solução Krebs - Henseleit é composta por NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, BSA, Glucose eHepes. Fukuse et al<sup>107</sup>., verificaram a influência das células vermelhas na função pulmonar em modelo de perfusão ex vivo. Comparando a solução de Krebs – Henseleit com a solução de Krebs-Henseleit acrescida de hemácia bovina com hematócrito de 38 %, observaram que a solução acrescida de hemácias mostrou menos edema, melhorando assim a sua integridade funcional.

Alguns grupos já utilizaram como agente diluidor do sangue dos animais doadores solução salina a 0,9%. No entanto, acreditamos que solução Krebs – Henseleit é mais fisiológica e conseqüentemente leva a uma menor reação celular. Simões et al<sup>77</sup>., mostraram que a hemodiluição do sangue para avaliação pulmonar *ex vivo* não interfere na troca gasosa obtendo resultados consistentes na avaliação.

A pressão da artéria pulmonar apresentou diferença estatística significante entre os grupos. O grupo choque apresentou os maiores valores atingindo média de 18,78 mmHg ao final da perfusão diferindo dos demais grupos. Este fato pode estar relacionado à indução da lesão pulmonar pelo choque hemorrágico que prejudica a permeabilidade capilar, aumentando a resistência vascular pulmonar. Os grupos que receberam tratamento com solução salina a 0,9% e solução hipertônica 7,5% após choque hemorrágico, não apresentaram diferença estatística significante, igualando-se ao grupo Sham. Desta forma o tratamento mostrou-se eficaz, mantendo os níveis pressóricos da artéria pulmonar semelhante à de doadores ideais. Observamos diferença estatística significante no primeiro momento da avaliação pulmonar ex vivo entre o grupo Sham vs Choque, já no segundo momento não há diferença entre os grupos, e nos demais momentos há diferença entre os grupos. Este fator pode estar relacionado à estabilização do sistema de perfusão ex vivo, nos primeiros dez minutos de perfusão aumentamos gradativamente o fluxo e ajustamos o volume corrente

Em relação aos parâmetros da mecânica ventilatória - como resistência pulmonar, volume corrente e complacência pulmonar - não observamos diferença estatística significante entre os grupos. Esperávamos que houvesse disparidade entre os grupos Choque vs Sham, SS e SH, no entanto, como isso não ocorreu, os dados sugerem que o choque hemorrágico não causou alteração da arquitetura pulmonar que levasse a uma piora da mecânica ventilatória. Uma hipótese levantada é que os 120 minutos do experimento não sejam suficientes para alterar a arquitetura pulmonar e ocasionar alteração na mecânica ventilatória.

O sistema que utilizamos para avaliação *ex vivo* não fornece os dados de resistência vascular pulmonar, o que proporcionaria uma melhor avaliação hemodinâmica da vasculatura do pulmão. Contudo, a pressão da artéria pulmonar é uma medida indireta da resistência vascular pulmonar. Neste estudo observamos de modo geral, que o grupo Choque ocasionou elevação da pressão em todos os momentos. Nos grupos com ressuscitação volêmica, seja com SS ou SH, a pressão da artéria pulmonar recuperou os níveis basais (Sham). Esperávamos algum efeito superior da solução hipertônica sobre a solução salina, mas a inexistência de diferença neste modelo mostra que a solução hipertônica é eficaz no tratamento do choque hemorrágico e não lesiona o pulmão a ponto de elevar a pressão da artéria pulmonar. Riverachavezet al., ainda observaram que a solução salina hipertônica diminui a resistência vascular pulmonar.

A capacidade relativa de oxigenação (CRO) vem sendo utilizada em diversos trabalhos como um método de quantificação da troca gasosa no modelo de avaliação *ex vivo*. Em nosso estudo não observamos diferença estatística significante entre os grupos. Em estudos que utilizam a mesma metodologia de avaliação *ex vivo* em diferentes solução de preservação também não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos em relação a capacidade relativa de oxigenação.

Existem dados conflitantes sobre a infusão da solução hipertônica em situações que o paciente possa correr o risco de desenvolver uma lesão pulmonar. Muitos estudos sugerem que a solução hipertônica possa produzir um efeito protetor na indução do choque hemorrágico em modelo experimental 89,90

Contudo Roch et al., em estudo experimental com porcos, demonstraram igualdade das soluções salina e solução hipertônica, na prevenção da lesão pulmonar ocasionada pelo choque hemorrágico<sup>89</sup>. Posteriormente, o mesmo autor publica um novo estudo sobre o efeito da solução salina hipertônica como pré-tratamento na isquemia e reperfusão em porcos. Seus resultados mostraram piora na lesão pulmonar dos animais que receberam o pré-tratamento com solução salina hipertônica. No entanto, o estudo apresenta a limitação que se refere à utilização do clampeamento da artéria, veia e brônquio ao invés de um modelo de transplante pulmonar<sup>91</sup>. Em um estudo com transplante cardíaco, Badiwala mostrou que o pré-tratamento em doador com solução hipertônica atenua a disfunção primária do enxerto pós transplante cardíaco.<sup>50</sup>

Apesar de nosso estudo não ter demonstrado superioridade da solução hipertônica em relação a solução salina na ressuscitação volêmica de doadores de pulmão com choque hemorrágico, existem autores que defendem seu efeito benéfico no tratamento do choque hemorrágico.

Outrossim, constatamos que a solução hipertônica é equivalente a solução salina no tratamento de choque hemorrágico com superioridade na recuperação da pressão arterial média, mais rápida e com menor volume. O choque hemorrágico elevou a quantificação do infiltrado neutrofílico e TNF-α, sem alterar citocinas tardias como a IL-6 e a IL-1β. Desse modo, os dados revelam a eficácia da solução hipertônica na ressuscitação volêmica em modelo animal de doador de pulmões com choque hemorrágico.



Pulmão de ratos submetidos ao choque hemorrágico e tratados através da reposição volêmica com Solução Hipertônica a 7,5% apresentam parâmetros de mecânica ventilatória semelhante e recuperação hemodinâmica melhor quando comparado aos animais tratados com a Solução Salina 0,9%.

A reposição volêmica com Solução Hipertônica a 7,5% diminui o infiltrado neutrofílico e a expressão de Tnf- $\alpha$  em pulmões de animais submetidos ao choque hemorrágico.

Tabela 1- Tabela com média e erro padrão do peso dos animais nos diferentes grupos

# Peso dos animais (g)

Grupos	Média	EP ±
Sham	324.9	16.46
Choque	350.1	14.25
SS	365.1	15.18
SH	358.3	15.83

Tabela 2- Tabela com média e erro padrão do volume de sangramento dos animais submetidos ao choque hemorrágico

### Volume de Sangramento (mL)

Grupos	Média	EP ±
Choque	7.4	1.31
SS	6.94	1.6
SH	6.67	1.09

Tabela 3- Tabela com média e erro padrão do volume de infusão da solução de tratamento dos animais

# Infusão de Volume (mL)

Grupos	Média	EP ±
SS	12.11	0.49
SH	1.43	0.06

Tabela 4- Tabela com média e erro padrão da pressão arterial média em mmHg dos animais

### Pressão Arterial Média (mmHg)

Grupo / Tempo(min)	Sham	Choque	SS	SH
Basal	113.8 ± 2.39	113.6 ± 1.64	114.25 ± 1.59	115.65 ± 1.55
10	113.1 ± 3.23	42.75 ± 0.67	43 ± 0.7	42.75 ± 0.58
20	112.05 ± 2.67	$43.35 \pm 0.46$	$43.6 \pm 0.4$	42.4 ± 0.57
30	112.95 ± 2.52	42.9 ± 0.53	43.45 ± 0.45	42.15 ± 0.51
40	114.75 ± 2.32	42.55 ± 0.49	43.4 ± 0.54	42.7 ± 0.48
50	114.35 ± 1.82	42.3 ± 0.65	41.75 ± 0.72	42.1 ± 0.77
60	113 ± 2.76	$42.3 \pm 0.62$	43.1 ± 0.58	41.7 ± 0.66
65	112.1 ± 2.82	42.4 ± 0.42	86.9 ± 4.7	87.4 ± 4.72
70	109.85 ±2.54	41.85 ± 0.62	91.7 ± 4.11	105.6 ± 3.4
75	111.65 ± 2.62	42.2 ± 0.63	96.65 ± 3.74	106.8 ± 2.9
80	104.95 ± 2.62	42.25 ± 0.44	101.45 ± 3.2	108 ± 3.24
85	106.9 ± 2.67	$41.8 \pm 0.07$	101.1 ± 3.19	107.5 ± 3.56
90	105.5 ± 2.98	40.75 ± 0.73	99.95 ± 2.72	108.15 ± 3.42
95	106.05 ± 2.18	40.95 ± 0.72	101.6 ± 2.54	107 ± 3.34
100	108.35 ± 2.71	40.45 ± 0.72	100.9 ± 2.88	107.45 ± 3.03
105	106.25 ± 2.67	41.15 ± 0.75	100.75 ± 3.05	106.65 ± 3.22
110	108.9 ± 2.8	41.5 ± 0.7	100 ± 3.18	105.35 ± 3.23
115	108.45 ± 2.9	41.45 ± 0.7	100.15 ± 3.41	106.4 ± 2.93
120	108.8 ± 3.01	41.1 ± 0.89	100.85 ± 3.35	106.65 ± 2.82

Tabela 5- Tabela com média e erro padrão da quantificação de infiltrado neutrofílico nos grupos de estudo

# Infiltrado Neutrofílico (cel/mm²)

Grupos	Média	EP ±
Sham	152.43	25.23
Choque	485.13	78.03
SS	238.01	50.34
SH	119.23	15.12

Tabela 6- Tabela com média e erro padrão com dosagem de TNF-α nos diferentes grupos

TNF- $\alpha$  (pg/mL)

Grupos	Média	EP ±
Sham	190.59	69.86
Choque	543.41	62.61
SS	138.48	44.93
SH	184.83	56.15

Tabela 7- Tabela com média e erro padrão com dosagem de IL1-β nos diferentes grupos

IL1-β (pg/mL)

Grupos	Média	EP ±
Sham	2207.65	402.67
Choque	3161.21	512.5
SS	1539.58	524.33
SH	1772.5	484.79

Tabela 8- Tabela com média e erro padrão com dosagem de IL6 nos diferentes grupos

IL-6 (pg/mL)

Grupos	Média	EP ±
Sham	2124	106.48
Choque	2205.2	118.5
SS	1774.8	214.18
SH	1837.4	241.07

Tabela 9- Tabela com média e erro padrão do peso úmido-peso seco *in vivo* dos grupos

# Razão peso úmido - peso seco

Grupos	Média	EP ±
Sham	2.87	0.15
Choque	2.6	0.16
SS	3.29	0.21
SH	3.39	0.12

Tabela 10- Tabela com média e erro padrão do volume corrente dos pulmões no sistema de perfusão *ex vivo* dos grupos

### **Volume Corrente(mL)**

Grupo / Momento	Sham	Choque	SS	SH
10	1.68± 0.28	1.71 ± 0.23	2.05 ± 0.27	1.83 ± 0.34
20	1.72 ± 0.29	1.72 ± 0.21	1.92 ± 0.22	1.72 ± 0.32
30	1.76 ± 0.30	1.65 ± 0.26	1.82 ± 0.24	1.72 ± 0.29
40	1.71 ± 0.29	1.65 ± 0.25	1.82 ± 0.26	1.69 ± 0.29
50	1.69 ± 0.29	1.62 ± 0.24	1.77 ± 0.27	1.65 ± 0.27
60	1.68 ± 0.28	1.60 ± 0.24	1.71 ± 0.28	1.62 ± 0.28

Tabela 11- Tabela com média e erro padrão de pressão da artéria pulmonar nos pulmões com avaliação no sistema de perfusão *exvivo* dos grupos

### Pressão Artéria Pulmonar(cmH2O)

Grupo / Momento	Sham	Choque	SS	SH
10	7.96± 0.64	14.65 ± 1.98	9.67 ± 1.28	9.25 ± 1.66
20	9.34 ± 0.74	13.76 ± 1.64	10.57 ± 1.04	9.34 ±1.61
30	8.70 ± 1.04	16.72 ± 2.53	11.12 ± 0.85	11.26 ± 1.10
40	10.38 ± 0.75	17.20± 2.10	11.77 ± 0.91	11.78 ± 0.88
50	10.45 ± 0.72	18.02 ± 2.13	11.92 ± 1.07	12.28 ± 1.05
60	10.78 ± 0.88	18.76 ± 2.29	11.88 ± 1.06	11.80 ± 1.10

Tabela 12- Tabela com média e erro padrão da complacência pulmonar nos pulmões com avaliação no sistema de perfusão *exvivo* dos grupos

# Complacência Pulmonar(cmH2O/mL)

Grupo / Momento	Sham	Choque	SS	SH
10	0.15± 0.02	0.13 ± 0.01	0.18 ±0.02	0.17 ± 0.03
20	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.03
30	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.03
40	0.15 ± 0.02	0.13± 0.02	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.03
50	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.03
60	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.03

Tabela 13- Tabela com média e erro padrão da resistência pulmonar nos pulmões com avaliação no sistema de perfusão *exvivo* dos grupos **Resistência Pulmonar (cmH2O/s/mL)** 

Grupo / Momento	Sham	Choque	SS	SH
10	0.39± 0.05	0.43 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.38 ± 0.04
20	0.37 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.34 ± 0.02	0.37 ± 0.04
30	0.37 ± 0.04	0.44± 0.04	0.34 ± 0.02	0.36 ± 0.03
40	0.37 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.03
50	0.37 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.34± 0.02	0.34 ± 0.03
60	0.35 ± 0.04	0.42± 0.03	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.03

Tabela 14- Tabela com média e erro padrão com a capacidade relativa de oxigenação (CRO) nos pulmões com avaliação no sistema de perfusão *exvivo* dos grupos.

### Capacidade Relativa de Oxigenação (ROC)

Grupo / Momento	Sham	Choque	SS	SH
10	29.42± 6.57	26.52 ± 6.94	25.23 ± 8.50	33.11 ± 6.94
20	23.56 ± 6.09	21.84 ± 6.42	25.31 ± 7.87	25.03 ± 6.42
30	25.75 ± 5.33	15.57 ± 5.61	20.30 ± 6.88	18.18 ± 5.61
40	27.58 ± 5.12	13.60± 5.39	20.32 ± 6.61	17.06 ± 5.39
50	28.17 ± 5.8	13.04 ± 6.19	16.84 ± 7.58	17.32 ± 6.20
60	26.90 ± 5.10	12.60 ± 5.38	12.81 ±6.59	18.94 ± 5.38

Tabela 15- Tabela com média e erro padrão do peso úmido-peso seco nos pulmões com avaliação no sistema de perfusão *ex vivo* dos grupos

# Razão peso úmido - peso seco ex vivo

Grupos	Média	EP ±
Sham	2.46	0.16
Choque	3.03	0.18
SS	3.1	0.21
SH	2.82	0.22



### CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06 de Junho de 2012, TOMOU CIÊNCIA do(s) documento(s) abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesauisa nº 253/10, intitulado: "TRATAMENTO DE PULMÕES SUBMETIDOS AO CHOQUE HIPOVOLÊMICO COM OU SEM REPOSIÇÃO VOLEMICA DE SOLUÇÃO HIPERTÔNICA: MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS" apresentado pela COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR.

> · Mudança de pesquisador executante para: Natalia Aparecida Nepomuceno, trata-se de um protocolo de pós-graduação com orientação do pesquisador responsável Marcos Naoyuki Samano

Pesquisador (a) Responsável: Marcos Naoyuki Samano

CEP-FMUSP, 06 de Junho de 2012

Prof. Dr. Roger Chammas Coordenador

Elliemum.

Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

Jata:	/	2011						EX	perimento	#:		
DOADOR Peso: g Volume de sangue retirado:							ml Volume de reposição:ml					
GRUPO	[ ]	Intacto [	] Contr	ole[]S	olução Sal	ina[]S	Solução H	Hipertônica a	7,5%			
PROTOC	OLO DE H	HIPOTEN	ISÃO									
	PA	Coleta	a de San	gue par	a Citocina	s Inicio	() Fina	I 60 ( ) Final	Rep ()			
Basal			Gaso/		P	CO <sub>2</sub>	PO <sub>2</sub>	Hct	BE	S	SatO <sub>2</sub>	
10 min		Tempo		art	: 6	art	art	art	art	art an		
20 min		In	icio									
30 min				-								
40 min		Final	60 min									
50 min		Final Reposi		-								
60 min			min									
PA Trata	mento	30										
		15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
20min 30min												
40min		_										
50min												
60min												
Gaso/	рН	рН	PCO <sub>2</sub>	PCO <sub>2</sub>	PO <sub>2</sub>	PO <sub>2</sub>	SatO <sub>2</sub>	SatO <sub>2</sub>				
Tempo	art	ven	art	ven	art	ven	art	ven				
10min							2.7.4					
20min												
20min												
30min												
30min 40min												
30min 40min 50min												
30min 40min												
30min 40min	peso U/S											
30min 40min 50min 60min Relação												
30min 40min 50min 60min Relação	peso U/S	gramas		F	Peso seco:		_gramas					
30min 40min 50min 60min Relação p	do:	gramas		F	Peso seco:		_gramas					
30min 40min 50min 60min Relação p Peso úmio	do: brana:	gramas		F	Peso seco:		_gramas					
30min 40min 50min 60min Relação p Peso úmio Uso Mem Pulmão P	do: brana: atologia		l de PBS					acerar e cen	itrífugar, colet	tar o sobi	enada	
30min 40min 50min 60min Relação p Peso úmio Uso Mem Pulmão P Citocinas	do: brana: atologia após perfi		l de PBS					acerar e cen	ntrífugar, colet	tar o sobi	renada	
30min 40min 50min 60min Relação p Peso úmio Uso Mem Pulmão P	do: brana: atologia após perfi		l de PBS					acerar e cen	itrífugar, colet	tar o sobi	renada	

Laboratório de Cirurgia Torácica - LIM 61



- Charman SC, Sharples LD, McNeil KD, Wallwork J. Assessment of survival benefit after lung transplantation by patient diagnosis. *J Heart Lung Transplant*. Feb 2002;21(2):226-232.
- 2. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant*. Oct 2014;33(10):1009-1024.
- 3. Wilkes DS. A breath of fresh air for lung transplant recipients. *Sci Transl Med.* Oct 2009;1(4):4ps5.
- **4.** Cypel M, Kaneda H, Yeung JC, et al. Increased levels of interleukin-1β and tumor necrosis factor- $\alpha$  in donor lungs rejected for transplantation. *J Heart Lung Transplant*. Apr 2011;30(4):452-459.
- **5.** Frost AE. Donor criteria and evaluation. *Clin Chest Med.* Jun 1997;18(2):231-237.
- 6. Pêgo-Fernandes PM, Samano MN, Fiorelli AI, et al. Recommendations for the use of extended criteria donors in lung transplantation. *Transplant Proc.* 2011 Jan-Feb 2011;43(1):216-219.
- 7. Fernandes PM, Samano MN, Junqueira JJ, Waisberg DR, Noleto GS, Jatene FB. [Lung donor profile in the State of São Paulo, Brazil, in 2006]. *J Bras Pneumol.* Jul 2008;34(7):497-505.
- 8. Cypel M, Sato M, Yildirim E, et al. Initial experience with lung donation after cardiocirculatory death in Canada. *J Heart Lung Transplant.* Aug 2009;28(8):753-758.

- **9.** Cypel M, Rubacha M, Yeung J, et al. Normothermic *ex vivo* perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. *Am J Transplant*. Oct 2009;9(10):2262-2269.
- **10.** Cypel M, Yeung JC, Liu M, et al. Normothermic *ex vivo* lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med.* Apr 2011;364(15):1431-1440.
- **11.** Cypel M, Yeung JC, Keshavjee S. Novel approaches to expanding the lung donor pool: donation after cardiac death and *ex vivo* conditioning. *Clin Chest Med.* Jun 2011;32(2):233-244.
- **12.** Tuttle-Newhall JE, Collins BH, Kuo PC, Schoeder R. Organ donation and treatment of the multi-organ donor. *Curr Probl Surg.* May 2003;40(5):266-310.
- **13.** Wilkes DS. A breath of fresh air for lung transplant recipients. *Sci Transl Med.* Oct 2009;1(4):4ps5.
- **14.** Ott L, McClain CJ, Gillespie M, Young B. Cytokines and metabolic dysfunction after severe head injury. *J Neurotrauma*. Oct 1994;11(5):447-472.
- **15.** Moore FA, McKinley BA, Moore EE. The next generation in shock resuscitation. *Lancet.* Jun 2004;363(9425):1988-1996.
- **16.** Noble WH. Early changes in lung water after haemorrhagic shock in pigs and dogs. *Can Anaesth Soc J.* Jan 1975;22(1):39-49.
- **17.** Swedberg J, Driggers D, Johnson R. Hemorrhagic shock. *Am Fam Physician*. Jul 1983;28(1):173-177.
- **18.** Gala GJ, Lilly MP, Thomas SE, Gann DS. Interaction of sodium and volume in fluid resuscitation after hemorrhage. *J Trauma*. Apr 1991;31(4):545-555; discussion 555-546.

- **19.** Mazzoni MC, Borgström P, Arfors KE, Intaglietta M. Dynamic fluid redistribution in hyperosmotic resuscitation of hypovolemic hemorrhage. *Am J Physiol.* Sep 1988;255(3 Pt 2):H629-637.
- **20.** Velasco IT, Rocha e Silva M, Oliveira MA, Silva RI. Hypertonic and hyperoncotic resuscitation from severe hemorrhagic shock in dogs: a comparative study. *Crit Care Med.* Mar 1989;17(3):261-264.
- **21.** Rocha-e-Silva M, Poli de Figueiredo LF. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics (Sao Paulo).* Apr 2005;60(2):159-172.
- **22.** Rocha-e-Silva M, Negraes GA, Soares AM, Pontieri V, Loppnow L. Hypertonic resuscitation from severe hemorrhagic shock: patterns of regional circulation. *Circ Shock*. 1986;19(2):165-175.
- **23.** Vincenzi R, Cepeda LA, Pirani WM, Sannomyia P, Rocha-E-Silva M, Cruz RJ. Small volume resuscitation with 3% hypertonic saline solution decrease inflammatory response and attenuates end organ damage after controlled hemorrhagic shock. *Am J Surg.* Sep 2009;198(3):407-414.
- **24.** Linden PK. History of solid organ transplantation and organ donation. *Crit Care Clin.* Jan 2009;25(1):165-184, ix.
- **25.** Langer RM. Vladimir P. Demikhov, a pioneer of organ transplantation. *Transplant Proc.* May 2011;43(4):1221-1222.
- **26.** Hardy JD. The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant Proc.* 1999 Feb-Mar 1999;31(1-2):25-29.

- **27.** Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. Toronto Lung Transplant Group. *N Engl J Med.* May 1986;314(18):1140-1145.
- **28.** Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA, et al. Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Feb 1987;93(2):173-181.
- **29.** Pasque MK, Cooper JD, Kaiser LR, Haydock DA, Triantafillou A, Trulock EP. Improved technique for bilateral lung transplantation: rationale and initial clinical experience. *Ann Thorac Surg.* May 1990;49(5):785-791.
- **30.** JJ C, MG R, ME O, DV G. Transplante isolado de pulmão: relato de caso realizado na América do Sul.Vol 161990.
- **31.** Jatene FB, Pêgo-Fernandes PM. Challenges in lung transplantation. *J Bras Pneumol.* May 2008;34(5):249-250.
- **32.** Registro Brasileiro de Transplantes. *Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2005- 20012)*Ano XVIII Nº 4.
- **33.** Pêgo-Fernandes PM, Samano MN, Junqueira JJM, Waisberg DR, Jatene FB. Perfil do doador de pulmão disponibilizado no Estado de São Paulo, Brasil, em 2006. *J Bras Pneumol.* Vol 342008:497-505.
- **34.** Junior FCdS, Junior JEA, Pêgo-Fernandes PM, Jatene FB. Lista de espera para transplante pulmonar no Estado de São Paulo; características dos pacientes e preditores de mortalidade. Vol 88(1). São Paulo: Rev Med; 2009:20-35.
- **35.** Marinho A, Cardoso SeS, Almeida VV. [Geographic disparities in organ transplantation in Brazil]. *Cad Saude Publica*. Apr 2010;26(4):786-796.
- **36.** Registro Brasileiro de Transplante. *Janeiro/ Setembro- 2013* Ano XIX nº3.

- 37. Schirmer J, Leite RF, Kian FM, et al. Legislação sobre doação de órgãos e tecidos: O que pensam os profissionais de UTI? Vol 9: J Bras Transpl.; 2006:469-473.
- **38.** de Perrot M, Snell GI, Babcock WD, et al. Strategies to optimize the use of currently available lung donors. *J Heart Lung Transplant*. Oct 2004;23(10):1127-1134.
- 39. Lucas BA, Vaughn WK, Spees EK, Sanfilippo F. Identification of donor factors predisposing to high discard rates of cadaver kidneys and increased graft loss within one year posttransplantation--SEOPF 1977-1982. South-Eastern Organ Procurement Foundation. *Transplantation*. Feb 1987;43(2):253-258.
- **40.** Busuttil RW, Goldstein LI, Danovitch GM, Ament ME, Memsic LD. Liver transplantation today. *Ann Intern Med.* Mar 1986;104(3):377-389.
- **41.** Harbrecht BG, Alarcon LH, Peitzman AB. *Managemente of Shock*. New York2004.
- **42.** Maier RV. Pathogenesis of multiple organ dysfunction syndromeendotoxin, inflammatory cells, and their mediators: cytokines and reactive oxygen species. *Surg Infect (Larchmt)*. 2000;1(3):197-204; discussion 204-195.
- **43.** Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury.* Jun 2005;36(6):691-709.
- **44.** Faist E, Angele M, Wichmann M. In: Graw-Hill M, ed. *Trauma 5º edition*2004:45-66.
- **45.** Cruz RJ, Yada-Langui MM, de Figueiredo LF, Sinosaki S, Rocha e Silva M. The synergistic effects of pentoxifylline on systemic and regional perfusion after

- hemorrhage and hypertonic resuscitation. *Anesth Analg.* May 2006;102(5):1518-1524.
- **46.** Schumacher J, Binkowski K, Dendorfer A, Klotz KF. Organ-specific extravasation of albumin-bound Evans blue during nonresuscitated hemorrhagic shock in rats. *Shock.* Dec 2003;20(6):565-568.
- **47.** Murao Y, Loomis W, Wolf P, Hoyt DB, Junger WG. Effect of dose of hypertonic saline on its potential to prevent lung tissue damage in a mouse model of hemorrhagic shock. *Shock*. Jul 2003;20(1):29-34.
- **48.** 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.* Jul 2003;76(1):244-252; discussion 252.
- **49.** Steen S, Sjöberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet.* Mar 2001;357(9259):825-829.
- **50.** Badiwala MV, Ramzy D, Tumiati LC, et al. Donor pretreatment with hypertonic saline attenuates primary allograft dysfunction: a pilot study in a porcine model. *Circulation*. Sep 2009;120(11 Suppl):S206-214.
- **51.** Steen S, Ingemansson R, Budrikis A, Bolys R, Roscher R, Sjöberg T. Successful transplantation of lungs topically cooled in the non-heart-beating donor for 6 hours. *Ann Thorac Surg.* Feb 1997;63(2):345-351.
- **52.** Wierup P, Haraldsson A, Nilsson F, et al. *Ex vivo* evaluation of nonacceptable donor lungs. *Ann Thorac Surg.* Feb 2006;81(2):460-466.

- 53. Steen S, Ingemansson R, Eriksson L, et al. First human transplantation of a nonacceptable donor lung after reconditioning *ex vivo*. *Ann Thorac Surg*. Jun 2007;83(6):2191-2194.
- 54. Ingemansson R, Eyjolfsson A, Mared L, et al. Clinical transplantation of initially rejected donor lungs after reconditioning ex vivo. Ann Thorac Surg. Jan 2009;87(1):255-260.
- 55. Cypel M, Yeung JC, Hirayama S, et al. Technique for prolonged normothermic *ex vivo* lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. Dec 2008;27(12):1319-1325.
- 56. Cypel M, Yeung JC, Perrot Md, Karolak W, Chen F, Sato M. *Ex vivo* lung perfusion in clinical lung transplantation the HELP trial. Vol 29(2S): J Heart Lung Transplant; 2010.
- **57.** Cypel M, Yeung JC, Liu M, et al. Normothermic *ex vivo* lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med.* Apr 2011;364(15):1431-1440.
- **58.** Cypel M, Yeung JC, Machuca T, et al. Experience with the first 50 *ex vivo* lung perfusions in clinical transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Nov 2012;144(5):1200-1206.
- **59.** Pêgo-Fernandes PM, de Medeiros IL, Mariani AW, et al. *Ex vivo* lung perfusion: early report of Brazilian experience. *Transplant Proc.* Mar 2010;42(2):440-443.
- **60.** Pêgo-Fernandes PM, Mariani AW, Medeiros IL, et al. *Ex vivo* lung evaluation and reconditioning. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2010 Oct-Dec 2010;25(4):441-446.

- **61.** Pêgo-Fernandes PM, Medeiros IL, Mariani AW, et al. *Ex vivo* lung perfusion: initial Brazilian experience. *J Bras Pneumol*. Nov 2009;35(11):1107-1111.
- 62. Medeiros IL, Pêgo-Fernandes PM, Mariani AW, et al. Histologic and functional evaluation of lungs reconditioned by *ex vivo* lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. Mar 2012;31(3):305-309.
- 63. Medeiros IL, Pêgo-Fernandes PM, Mariani AW, et al. Histologic and functional evaluation of lungs reconditioned by *ex vivo* lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. Nov 2011.
- 64. Mariani AW, Pêgo-Fernandes PM, Abdalla LG, Jatene FB. *Ex vivo* lung reconditioning: a new era for lung transplantation. *J Bras Pneumol.* 2012 Nov-Dec 2012;38(6):776-785.
- **65.** Cypel M, Liu M, Rubacha M, et al. Functional repair of human donor lungs by IL-10 gene therapy. *Sci Transl Med.* Oct 2009;1(4):4ra9.
- 66. Hirayama S, Sato M, Loisel-Meyer S, et al. Lentivirus IL-10 gene therapy down-regulates IL-17 and attenuates mouse orthotopic lung allograft rejection. *Am J Transplant*. Jun 2013;13(6):1586-1593.
- **67.** Ott HC, Clippinger B, Conrad C, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med.* Aug 2010;16(8):927-933.
- **68.** Song JJ, Kim SS, Liu Z, et al. Enhanced *in vivo* function of bioartificial lungs in rats. *Ann Thorac Surg.* Sep 2011;92(3):998-1005; discussion 1005-1006.
- **69.** Goto T, Kohno M, Anraku M, Ohtsuka T, Izumi Y, Nomori H. Simplified rat lung transplantation using a new cuff technique. *Ann Thorac Surg.* Jun 2012;93(6):2078-2080.

- **70.** Zhai W, Ge J, Inci I, et al. Simplified rat lung transplantation by using a modified cuff technique. *J Invest Surg.* 2008 Jan-Feb 2008;21(1):33-37.
- **71.** Wang LS, Yoshikawa K, Miyoshi S, et al. The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a simple *ex vivo* rabbit model used for functional assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Sep 1989;98(3):333-342.
- **72.** DeCampos KN, Waddell TK, Slutsky AS, Post M, Patterson GA. Assessment of postpreservation rat lung function using a new model for extended venous reperfusion. *J Appl Physiol (1985)*. Oct 1993;75(4):1890-1896.
- **73.** Weder W, Harper B, Shimokawa S, et al. Influence of intraalveolar oxygen concentration on lung preservation in a rabbit model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Jun 1991;101(6):1037-1043.
- **74.** Pêgo-Fernandes PM, Werebe E, Cardoso PF, et al. Experimental model of isolated lung perfusion in rats: first Brazilian experience using the IL-2 isolated perfused rat or guinea pig lung system. *Transplant Proc.* Mar 2010;42(2):444-447.
- **75.** Pêgo-Fernandes PM, Werebe EeC, Cardoso PF, et al. Experimental model of isolated lung perfusion in rats: technique and application in lung preservation studies. *J Bras Pneumol.* Aug 2010;36(4):490-493.
- **76.** Soares PR, Braga KA, Nepomuceno NA, et al. Comparison between Perfadex and locally manufactured low-potassium dextran solution for pulmonary preservation in an *ex vivo* isolated lung perfusion model. *Transplant Proc.* 2011 Jan-Feb 2011;43(1):84-88.
- 77. Simões EA, Pêgo-Fernandes PM, Cardoso PF, et al. Comparing the performance of rat lungs preserved for 6 or 12 hours after perfusion with

- low-potassium dextran or histidine-tryptophan-ketoglutarate. *Transplant Proc.* Jun 2011;43(5):1520-1524.
- 78. Simões EA, Cardoso PF, Pêgo-Fernandes PM, et al. An experimental rat model of *ex vivo* lung perfusion for the assessment of lungs regarding histopathological findings and apoptosis: low-potassium dextran vs. histidine-tryptophan-ketoglutarate. *J Bras Pneumol.* 2012 Jul-Aug 2012;38(4):461-469.
- **79.** Menezes AQ, Pêgo-Fernandes PM, Cardoso PF, et al. Comparison of Celsior and Perfadex lung preservation solutions in rat lungs subjected to 6 and 12 hours of ischemia using an ex-vivo lung perfusion system. *Clinics (Sao Paulo)*. Nov 2012;67(11):1309-1314.
- **80.** Cardoso PF, Pazetti R, Moriya HT, et al. An experimental rat model of *ex vivo* lung perfusion for the assessment of lungs after prostacyclin administration: inhaled versus parenteral routes. *J Bras Pneumol.* 2011 Sep-Oct 2011;37(5):589-597.
- **81.** WG P. The treatment of severe and progressive hemorrage intravenous injections. Vol 48: Am J Physiol; 1919:121-128.
- **82.** Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* Nov 1980;239(5):H664-673.
- **83.** de Felippe J, Timoner J, Velasco IT, Lopes OU, Rocha-e-Silva M. Treatment of refractory hypovolaemic shock by 7.5% sodium chloride injections. *Lancet*. Nov 1980;2(8202):1002-1004.

- **84.** Nakayama S, Sibley L, Gunther RA, Holcroft JW, Kramer GC. Small-volume resuscitation with hypertonic saline (2,400 mOsm/liter) during hemorrhagic shock. *Circ Shock*. 1984;13(2):149-159.
- **85.** Smith GJ, Kramer GC, Perron P, Nakayama S, Gunther RA, Holcroft JW. A comparison of several hypertonic solutions for resuscitation of bled sheep. *J Surg Res.* Dec 1985;39(6):517-528.
- **86.** Kramer GC, Perron PR, Lindsey DC, et al. Small-volume resuscitation with hypertonic saline dextran solution. *Surgery.* Aug 1986;100(2):239-247.
- **87.** Poli de Figueiredo LF, Peres CA, Attalah AN, et al. Hemodynamic improvement in hemorrhagic shock by aortic balloon occlusion and hypertonic saline solutions. *Cardiovasc Surg.* Dec 1995;3(6):679-686.
- **88.** Roch A, Blayac D, Ramiara P, et al. Comparison of lung injury after normal or small volume optimized resuscitation in a model of hemorrhagic shock. *Intensive Care Med.* Sep 2007;33(9):1645-1654.
- **89.** Angle N, Hoyt DB, Coimbra R, et al. Hypertonic saline resuscitation diminishes lung injury by suppressing neutrophil activation after hemorrhagic shock. *Shock*. Mar 1998;9(3):164-170.
- **90.** Deitch EA, Shi HP, Feketeova E, Hauser CJ, Xu DZ. Hypertonic saline resuscitation limits neutrophil activation after trauma-hemorrhagic shock. *Shock*. Apr 2003;19(4):328-333.
- **91.** Roch A, Castanier M, Mardelle V, et al. Effect of hypertonic saline pretreatment on ischemia-reperfusion lung injury in pig. *J Heart Lung Transplant*. Sep 2008;27(9):1023-1030.

- 92. Chen C, Zhang F, Zhang Z, Peng M, Wang Y, Chen Y. TLR4 signaling-induced heme oxygenase upregulation in the acute lung injury: role in hemorrhagic shock and two-hit induced lung inflammation. *Mol Biol Rep.* Feb 2013;40(2):1167-1172.
- **93.** Prunet B, Prat N, Couret D, et al. Midterm effects of fluid resuscitation strategies in an experimental model of lung contusion and hemorrhagic shock. *Shock*. Feb 2014;41(2):159-165.
- **94.** Gryth D, Rocksén D, Drobin D, et al. Effects of fluid resuscitation with hypertonic saline dextrane or Ringer's acetate after nonhemorrhagic shock caused by pulmonary contusion. *J Trauma*. Oct 2010;69(4):741-748.
- **95.** Koller ME, Berg A, Rodt SA, Westerberg E, Reed RK. alpha-Trinositol prevents increased negativity of interstitial fluid pressure in rat skin and trachea induced by dextran anaphylaxis. *Eur J Pharmacol*. Jul 1997;331(2-3):259-266.
- **96.** Koller ME, Reed RK. Increased negativity of interstitial fluid pressure in rat trachea in dextran anaphylaxis. *J Appl Physiol (1985)*. Jan 1992;72(1):53-57.
- **97.** ES H, M M, RC M, MJP F. Modelo Experimental de Choque Hemorragico.Vol 18. Acta Cir Bras2003:465-470.
- **98.** Yang R, Tan X, Kenney RJ, et al. Hemorrhagic shock in the rat: comparison of carotid and femoral cannulation. *J Surg Res.* Jan 2008;144(1):124-126.
- **99.** Fernandes CI, Llimona F, Godoy LC, et al. Treatment of hemorrhagic shock with hypertonic saline solution modulates the inflammatory response to live bacteria in lungs. *Braz J Med Biol Res.* Oct 2009;42(10):892-901.

- **100.** Watters JM, Tieu BH, Differding JA, Muller PJ, Schreiber MA. A single bolus of 3% hypertonic saline with 6% dextran provides optimal initial resuscitation after uncontrolled hemorrhagic shock. *J Trauma*. Jul 2006;61(1):75-81.
- **101.** Letson HL, Dobson GP. Unexpected 100% survival following 60% blood loss using small-volume 7.5% NaCl with adenocaine and Mg(2+) in the rat model of extreme hemorrhagic shock. *Shock.* Dec 2011;36(6):586-594.
- **102.** Yu YH, Zhao KS, Gong SP. [Effect of limited volume resuscitation on hemodynamic changes in pregnant rabbit with hemorrhagic shock]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* Jan 2008;43(1):50-53.
- **103.** Yu TC, Yang FL, Hsu BG, et al. Deleterious effects of aggressive rapid crystalloid resuscitation on treatment of hyperinflammatory response and lung injury induced by hemorrhage in aging rats. *J Surg Res.* Nov 2013.
- **104.** Nydam TL, Moore EE, McIntyre RC, et al. Hypertonic saline attenuates TNF-alpha-induced NF-kappaB activation in pulmonary epithelial cells. *Shock.* May 2009;31(5):466-472.
- **105.** Gurfinkel V, Poggetti RS, Fontes B, da Costa Ferreira Novo F, Birolini D. Hypertonic saline improves tissue oxygenation and reduces systemic and pulmonary inflammatory response caused by hemorrhagic shock. *J Trauma*. Jun 2003;54(6):1137-1145.
- **106.** Xie K, Yu Y, Pei Y, et al. Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release. *Shock.* Jul 2010;34(1):90-97.

- **107.** Fukuse T, Albes JM, Takahashi Y, Brandes H, Hausen B, Schäfers HJ. Influence of red blood cells on lung function in an *ex vivo* rat heart-lung model. *J Surg Res.* Sep 1995;59(3):399-404.
- 108. Rivera-Chavez FA, Huerta S, Brown R, York GB, Minei JP. Resuscitation from hemorrhagic shock comparing standard hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC)-201 versus 7.5% hypertonic HBOC-201. *J Trauma*. Nov 2007;63(5):1113-1119.