

ISRAEL LOPES DE MEDEIROS

Comparação entre as soluções de
preservação pulmonar Perfadex[®] e LPD-G
nacional em pulmões humanos com um
modelo de perfusão pulmonar *ex vivo*

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

Programa de: Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes

SÃO PAULO

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Medeiros, Israel Lopes de

Comparação entre as soluções de preservação pulmonar Perfadex® e LPD-G nacional em pulmões humanos com um modelo de perfusão pulmonar *ex vivo* / Israel Lopes de Medeiros. -- São Paulo, 2011.

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Paulo Manuel Pêgo Fernandes.

Descritores: 1.Transplante de pulmão 2.Soluções para preservação de órgãos
3.Traumatismo por reperfusão 4.Lesão pulmonar aguda

USP/FM/DBD-377/11

Dedicatória

À minha mãe, Lúcia, exemplo de generosidade e retidão, que sempre incentivou e apoiou todos os meus projetos.

À minha amada esposa, Iole, pelos inúmeros sacrifícios e concessões ao longo dessa jornada... Seu amor, companheirismo e suporte emocional tornaram possível essa conquista.

Às famílias dos pacientes que doaram seus órgãos para o desenvolvimento dessa pesquisa... Seu exemplo de solidariedade nos estimula a trabalhar cada vez mais pelo progresso da medicina.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes, pela oportunidade de desenvolver esse projeto de pesquisa, pela disponibilidade, orientação e apoio constante em todas as etapas desse trabalho.

Ao Dr. Alessandro Wasum Mariani, pela ajuda técnica e intelectual em todas as etapas desse projeto, desde a sua concepção até a sua execução, incluindo nas inúmeras cirurgias para a captação do bloco pulmonar, a maioria realizada no período da noite.

Aos cirurgiões do grupo de transplante pulmonar do InCor, Dr. Marcos Naoyuki Samano e Dr. Eduardo de Campos Werebe, pelas orientações e conselhos que nos possibilitaram executar os procedimentos cirúrgicos envolvidos nessa pesquisa.

Aos colegas de pós-graduação Artur Eugênio de Azevedo Pereira e Lucas Matos Fernandes, e aos acadêmicos Flávio Guimarães Fernandes e Fernando do Vale Unterpertinger, pelos conselhos, sugestões e pela participação ativa em vários casos do presente estudo.

Ao Dr. Mauro Canzian, médico patologista, pela disponibilidade e ajuda na elaboração e execução da metodologia para análise histopatológica das amostras de tecido de todos os nossos casos, mostrando sempre bom senso, competência e organização.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira pelas orientações na elaboração da metodologia e análise estatística.

Aos biólogos do LIM-61, Karina Andrighetti, Rogério Pazetti, Natália Nepomuceno e Liliane Ruiz, pela inestimável colaboração em etapas importantes da elaboração do projeto de pesquisa, incluindo a busca de financiamento, aquisição de equipamentos, elaboração de relatórios e artigos científicos.

Aos funcionários do museu anatômico cirúrgico, Aristides Tadeu Correia e Márcia Cristina Augusto, pela sua constante disposição em colaborar com a pesquisa e pelas orientações imprescindíveis sobre metodologia científica e análise estatística.

Aos funcionários do Serviço de Cirurgia Torácica, Roseli Oliveira Araújo, Sonia Sposito, Eliana Ogata e Rosangela Monteiro pela ajuda com as tarefas administrativas, criando a logística necessária à realização da pesquisa.

Aos funcionários da Divisão Cirúrgica Experimental, Suely, Nelsinho, Richard, Elenice e Eduardo pelo apoio e pela disposição em ajudar.

Às funcionárias da Coordenadoria de Pós-Graduação do InCor, Neusa Rodrigues Dini, Juliana Lattari Sobrinho e Eva Malheiros Guiss de Oliveira, sempre presentes e atenciosas, nos ajudando em todas as tarefas da pós-graduação.

Aos companheiros da Clínica de Cirurgia Torácica, Dr. Angelo Fernandez, Dr. Ricardo Terra, Dr. Ricardo Bammann, Dra. Ana Cristina Castro e Dr. Augusto Ishy, por me introduzirem à prática da cirurgia torácica em sua clínica privada e por me mostrarem que é possível combinar a prática médica assistencial com a pesquisa e a prática acadêmica.

Ao Dr. Antero Gomes Neto, amigo e mentor, exemplo de médico humano e competente, pela ajuda e apoio constante ao longo dessa jornada.

Ao Dr. Luiz Augusto Pereira, coordenador da Central de Transplantes do Estado de São Paulo, pelo apoio dado ao projeto possibilitando a sua execução.

Ao grupo de enfermeiros das Organizações de Procura de Órgãos (OPO) do Hospital das Clínicas (HCFMUSP) e da Santa Casa de São Paulo, e aos seus coordenadores, Dr. Leonardo Borges de Barros e Silva e Dr. Reginaldo Carlos Boni, respectivamente. São profissionais brilhantes, cujo trabalho faz com que dezenas de pessoas continuem a viver através de um transplante. Suas habilidades para cuidar dos doadores de órgãos e a sua capacidade de dialogar com os familiares em um momento tão difícil foram fundamentais para a realização de nossa pesquisa.

Muito obrigado!

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a. ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Sumário

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	8
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3.1	Histórico da preservação pulmonar.....	11
3.2	Soluções de preservação pulmonar.....	16
3.3	Modelos experimentais para estudo da preservação pulmonar.....	22
3.3.1	Modelos animais.....	22
3.3.2	O modelo de perfusão <i>ex vivo</i> em pulmões humanos.....	25
4	MÉTODOS.....	30
4.1	Delineamento do estudo.....	32
4.2	Procedimentos.....	34
4.2.1	Captação pulmonar.....	34
4.2.2	Avaliação pulmonar <i>ex vivo</i>	36
4.3	Variáveis do estudo.....	42
4.3.1	Fluxo de perfusão.....	42
4.3.2	Variação do peso.....	42
4.3.3	Avaliação funcional.....	43

4.3.4	Avaliação hemodinâmica.....	43
4.3.5	Avaliação ventilatória.....	44
4.3.6	Razão peso úmido-peso seco.....	44
4.3.7	Avaliação histológica.....	44
4.4	Análise estatística.....	47
5	RESULTADOS.....	49
5.1	Fluxo de perfusão.....	52
5.2	Variação do peso.....	53
5.3	Avaliação funcional.....	55
5.4	Avaliação hemodinâmica.....	56
5.5	Avaliação ventilatória.....	57
5.6	Razão peso úmido-peso seco.....	58
5.7	Avaliação histológica.....	58
6	DISCUSSÃO.....	61
6.1	Casuística.....	63
6.2	Fluxo de perfusão.....	65
6.3	Edema pulmonar.....	65
6.4	Avaliação funcional.....	66
6.5	Avaliação histológica.....	68
6.6	Considerações finais.....	71
7	CONCLUSÃO.....	73
8	REFERÊNCIAS.....	75

Esta pesquisa recebeu subsídio financeiro

FAPESP – Auxílio Pesquisa Regular – Processo 07/58145-3

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Estratégia para execução da perfusão pulmonar *ex vivo*.....41
- Tabela 2.** Características clínicas e demográficas dos doadores.....51
- Tabela 3.** Avaliação histológica dos pulmões doados..... 51

Lista de Figuras

- Figura 1.** O sistema de perfusão pulmonar *ex vivo*: conjunto de tubos para circulação extracorpórea, bomba centrífuga, reservatório venoso e oxigenador de membranas. Nota-se ao fundo da imagem o bloco pulmonar na XVIVO[®] Chamber..... 37
- Figura 2.** Caixa para suporte do bloco pulmonar (XVIVO[®] Chamber) no sistema de perfusão pulmonar *ex vivo*..... 38
- Figura 3.** Tubo orotraqueal introduzido na traquéia e cânula acoplada ao tronco da artéria pulmonar..... 39
- Figura 4.** Detalhe da cânula introduzida no tronco da artéria pulmonar (à esquerda). A sonda embutida na cânula era conectada a um transdutor de pressão permitindo a monitorização contínua da pressão de artéria pulmonar (à direita)..... 39
- Figura 5.** Identificação das células apoptóticas (400X) no *software* AxioVision (setas)..... 47

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Medida do fluxo de perfusão (F_p) das soluções de preservação durante a captação dos pulmões.....	52
Gráfico 2. Variação de peso (ΔP_i) dos blocos pulmonares após o período de isquemia.....	53
Gráfico 3. Variação de peso (ΔP_i) dos blocos pulmonares após reperfusão.....	54
Gráfico 4. Capacidade de oxigenação (ΔP_{O_2}) dos pulmões após reperfusão.....	55
Gráfico 5. Resistência vascular dos pulmões (RVP) após reperfusão.....	56
Gráfico 6. Complacência pulmonar (CP) após reperfusão.....	57
Gráfico 7. Razão peso úmido-peso seco do pulmão esquerdo ao final da reperfusão.....	58
Gráfico 8. Comparação do Escore de Lesão Pulmonar (ELP) entre os grupos de estudo, obtidos em dois tempos: após 10 horas de isquemia fria e após 1 hora de reperfusão normotérmica.....	59
Gráfico 9. Comparação da contagem de células apoptóticas entre os dois grupos de estudo em dois tempos: após 10 horas de isquemia fria e após 1 hora de reperfusão normotérmica.....	60

Resumo

MEDEIROS IL. *Comparação entre as soluções de preservação Perfadex e LPD-G nacional com um modelo de perfusão pulmonar ex vivo* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 86 p.

INTRODUÇÃO: As técnicas de preservação pulmonar visam a melhorar a qualidade do enxerto e aumentar sua tolerância ao período de isquemia fria. A técnica mais usada atualmente consiste na perfusão da artéria pulmonar com Perfadex. O alto custo associado à importação dessa solução e as dificuldades logísticas dos portos e aeroportos brasileiros com relação a materiais médico-hospitalares têm causado problemas para os centros de transplante pulmonar brasileiros. Daí a necessidade de uma solução de preservação pulmonar produzida no Brasil. O objetivo desse estudo é comparar a solução Perfadex com a solução de fabricação nacional LPD-G, quanto ao grau de lesão de isquemia-reperusão, em um modelo de perfusão pulmonar *ex vivo* (PPEV). **MÉTODOS:** Foram usados doadores em morte cerebral, cujos pulmões foram recusados. Cada caso era incluído aleatoriamente em um dos grupos: Grupo 1, a preservação pulmonar era realizada com Perfadex, e Grupo 2, era usado o LPD-G, solução fabricada no Brasil com composição idêntica a do Perfadex. Após a captação, os pulmões eram armazenados a 4 °C por 10 horas. A reperusão ocorria em um sistema de PPEV, no qual o bloco pulmonar era ventilado e perfundido por uma solução acelular a 37 °C por 60 minutos. A lesão de isquemia-reperusão era medida através de parâmetros funcionais (gasometria, resistência vascular pulmonar, complacência pulmonar, relação peso úmido/peso seco) e histológicos. Foram feitas biópsias pulmonares em 3 tempos: antes da captação, após o período de isquemia fria e depois da reperusão. Vários critérios foram usados (edema alveolar, edema intersticial, hemorragia etc.) para criar um Escore de Lesão Pulmonar (ELP). A contagem de células apoptóticas foi feita usando a metodologia TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*). **RESULTADOS:** Após a reperusão, a capacidade de oxigenação média foi de 405,3 mmHg no Grupo 1 e 406,0 mmHg no Grupo 2 ($p = 0,98$). A mediana da resistência vascular pulmonar nos pulmões do Grupo 1 foi de 697,6 dina.s.cm⁻⁵, enquanto no Grupo 2, esse valor foi de 378,3 dina.s.cm⁻⁵ ($p = 0,035$). A complacência pulmonar média ao final da reperusão foi de 46,8 cmH₂O no Grupo 1 e de 49,3 ml/cmH₂O no Grupo 2 ($p = 0,816$). A razão entre o peso úmido e o peso seco foi em média 2,06 e 2,02 nos Grupos 1 e 2, respectivamente ($p = 0,87$). Na biópsia realizada após reperusão, o ELP médio foi de 4,37 e 4,37 nos Grupos 1 e 2, respectivamente ($p = 1,0$); a contagem de células apoptóticas foi de 118,75/mm² e 137,50/mm² nos Grupos 1 e 2, respectivamente ($p = 0,71$). **CONCLUSÕES:** A qualidade da preservação pulmonar obtida com a solução LPD-G nacional é semelhante a obtida com o Perfadex. A aplicação clínica da nova solução pode reduzir custos, facilitando a manutenção e a abertura de centros de transplante pulmonar.

Descritores: Transplante de Pulmão, Soluções para Preservação de Órgãos, Traumatismo por Reperusão, Lesão Pulmonar Aguda

Summary

MEDEIROS IL. *Comparison between lung preservation solutions Perfadex and LPD-G with a ex vivo lung perfusion model* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 86 p.

INTRODUCTION: Pulmonary preservation techniques aim at improving graft quality and increasing tolerance during reperfusion and cold ischemia times. Currently, the most used technique consists of pulmonary artery antegrade perfusion with Perfadex. The high cost associated with the importation of this solution and the logistical difficulties of our ports and airports regarding medical supplies have caused problems for lung transplant centers in Brazil. Therefore there is need for a preservation solution manufactured in Brazil. The aim of this study is to compare the pulmonary preservation solutions Perfadex and LPD-G manufactured in Brazil in an ex vivo lung perfusion (EVLP) model. **METHODS:** Donors with brain death, whose lungs had been declined by transplantation teams were used. Cases were randomized into two groups: in Group 1, Perfadex was used for pulmonary preservation. In Group 2, LPDnac, a solution manufactured in Brazil and whose composition is identical to Perfadex, was used. After harvesting, lungs were stored at 4 °C for 10 hours. An EVLP system was used and the pulmonary block was ventilated and perfused by an acellular solution at 37 °C for 60 minutes. Ischemic-reperfusion injury was measured by functional (blood gas, pulmonary vascular resistance, lung compliance, wet/dry weight ratio) and histological parameters. Pulmonary biopsies were performed at three time points: before harvesting, 10 hours after cold ischemia and 60 minutes after reperfusion. Samples were prepared for light microscopy analysis. Several criteria were used (alveolar edema, interstitial edema, hemorrhage etc.) to create a lung injury score (LIS). Apoptotic cell count was carried out using the TUNEL methodology (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*). **RESULTS:** After reperfusion, mean oxygenation capacity was 406.0 mmHg in Group 2 and 405.3 mmHg in Group 1 ($p = 0.98$). Mean pulmonary vascular resistance in Group 2 lungs was $378.3 \text{ dina.s.cm}^{-5}$, whereas in Group 1 it was $697.6 \text{ dina.s.cm}^{-5}$ ($p = 0.035$). Mean pulmonary compliance by the end of reperfusion was $49.3 \text{ ml/cmH}_2\text{O}$ in Group 2 and $46.8 \text{ cmH}_2\text{O}$ in Group 1 ($p = 0.816$). Mean wet/dry weight ratio was 2.02 and 2.06 in Groups 2 and 1, respectively ($p = 0.87$). Mean LIS for the biopsy performed after reperfusion was 4.37 and 4.37 in Groups 2 and 1, respectively ($p = 1.0$); apoptotic cell count was $137.50/\text{mm}^2$ and $118.75/\text{mm}^2$ in Groups 2 and 1, respectively ($p = 0.71$). **CONCLUSION:** The preservation solution manufactured in Brazil proved to be as good as Perfadex. The clinical application for the new solution may reduce costs, favoring the maintenance and opening of pulmonary transplantation centers.

Descriptors: Lung Transplantation, Organ Preservation Solutions, Reperfusion Injury, Acute Lung Injury

1 INTRODUÇÃO

O transplante de órgãos sólidos foi um dos maiores avanços da medicina nos últimos 100 anos. Partindo de estudos experimentais em modelos animais no início do século XX, o transplante tornou-se uma terapia de rotina em muitas instituições nos dias de hoje, na medida em que se mostrou um tratamento eficaz para diversas doenças em estágio terminal. O enorme progresso alcançado nessa área resultou da confluência de uma série de fatores: aceitação cultural; mudanças na legislação reguladora para facilitar a doação, procura e captação de órgãos; aprimoramento das técnicas cirúrgicas e anestésicas; ampliação dos conhecimentos nas áreas de preservação de órgãos e tecidos, imunologia, imunossupressão e microbiologia.

As bases das modernas técnicas cirúrgicas empregadas nos transplantes foram introduzidas no início do século passado pelo cirurgião francês Alexis Carrel, que aperfeiçoou os métodos de sutura e anastomose vascular, realizando vários autotransplantes e alotransplantes em cães, trabalho que lhe rendeu o Prêmio Nobel de 1912¹. Os primeiros transplantes bem-sucedidos realizados em humanos ocorreram nas décadas de 1950 (rim) e 1960 (coração e fígado)¹.

O interesse pelo transplante isolado de pulmão começou na década de 1940, quando o russo Vladimir Demikhov realizou os primeiros transplantes pulmonares em animais^{2,3}. Em 1950, o francês Henri Metras publicou sua experiência com o alotransplante pulmonar unilateral em cães. Algumas

técnicas desenvolvidas por Metras são utilizadas até os dias atuais, como o implante das veias pulmonares juntas em um *cuff* atrial, suturado diretamente no átrio do receptor². Em junho de 1963, após uma extensa experiência em animais, a equipe do Dr. James Hardy, da Universidade do Mississippi, realizou o primeiro transplante pulmonar unilateral em humano. O receptor, um homem de 58 anos portador de grave enfisema e carcinoma de pulmão, evoluiu com melhora significativa da função pulmonar, mas morreu após 18 dias por insuficiência renal². Apesar da curta sobrevivência, o procedimento mostrou a viabilidade técnica do transplante pulmonar e a capacidade funcional do enxerto após o implante. Apesar do entusiasmo inicial, apenas 40 tentativas de transplante pulmonar foram feitas nas duas décadas que se seguiram, todas com resultados ruins e sobrevivências que não passavam de algumas semanas. A maioria dos óbitos ocorria nas primeiras duas semanas e resultava de insuficiência respiratória por infecção ou rejeição aguda. Os poucos pacientes que sobreviviam além desse período, morriam em decorrência de complicações associadas à anastomose brônquica.

O início da década de 1980 foi marcado por um dos maiores avanços na medicina do transplante: o surgimento do imunossupressor ciclosporina¹. Nesse mesmo período, o grupo de transplante pulmonar de Toronto, liderado pelo Dr. Joel Cooper, iniciou uma série de trabalhos experimentais, que comprovaram que o uso de corticóides como imunossupressor contribuía para a elevada incidência de complicações de anastomose brônquica, como estenose e deiscência; a substituição dos corticóides pela

ciclosporina, bem como a proteção da anastomose com omento, melhorava a cicatrização do brônquio, evitando essas complicações^{4,5}. Em novembro de 1983, o grupo de Toronto realizou o primeiro transplante pulmonar unilateral da chamada “era da ciclosporina”. O receptor era um homem de 53 anos com fibrose pulmonar idiopática que viveu por mais seis anos². O mesmo grupo, em 1989, realizou o primeiro transplante pulmonar bilateral seqüencial, que se tornou o procedimento de escolha para as doenças supurativas⁶.

No Brasil, os primeiros transplantes de pulmão foram feitos na Santa Casa de Porto Alegre, em maio de 1989, e no Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina, em julho de 1990⁷.

Segundo dados da *International Society of Heart and Lung Transplantation* (ISHLT), mais de 25000 transplantes de pulmão já foram realizados desde 1990, em 153 centros cadastrados em todo o mundo⁸. No Brasil, de acordo com a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), mais de 400 transplantes pulmonares já foram feitos desde o ano 2000, sendo 60 procedimentos em 2010, a maioria deles ocorrendo nos centros da Santa Casa de Porto Alegre e do Instituto do Coração (InCor) de São Paulo⁹.

A falência aguda do enxerto após o transplante pulmonar permanece como uma significativa causa de morbidade e mortalidade precoces¹⁰. Apesar dos avanços ocorridos no campo da preservação pulmonar, a chamada Disfunção Primária do Enxerto (DPE) ainda acontece em 11% a 25% dos receptores, sendo responsável por 30% dos óbitos nos primeiros

30 dias pós-transplante¹¹⁻¹³. Essa síndrome ocorre tipicamente nas primeiras 72 horas após o implante, e se caracteriza por hipoxemia, infiltrado pulmonar na radiografia de tórax, redução da complacência, aumento da resistência vascular pulmonar e dano alveolar difuso na análise histológica. A DPE é o resultado de uma série de eventos que se iniciam antes mesmo da morte cerebral (ventilação mecânica prolongada, broncoaspiração, pneumonia, trauma, múltiplas hemotransfusões, instabilidade hemodinâmica) e vão até a reperfusão do enxerto¹³.

A lesão de isquemia-reperfusão (LIR) é considerada a principal causa de DPE¹⁰. O período de isquemia fria está associado a uma série de eventos deletérios: formação de radicais livres de oxigênio, inativação da bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+ -ATPase), sobrecarga intracelular de cálcio, morte celular (apoptose/necrose)¹⁴. A LIR envolve a ativação de moléculas de adesão de superfície celular (selectinas, integrinas) e a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-8, IL-12, IL-18), metabólitos do ácido aracdônico (tromboxanos, leucotrienos, prostaglandinas) e fator de ativação plaquetária. A LIR ocorre em um padrão bifásico: a fase precoce (24 horas) é mediada pelos macrófagos do doador, ativados durante o período de isquemia fria; as citocinas liberadas pelos mesmos estimulam a ativação e o recrutamento dos neutrófilos e linfócitos do receptor, que amplificam e perpetuam a injúria pulmonar na fase tardia da reperfusão^{11,12}.

O objetivo da preservação pulmonar é reduzir a incidência da LIR e, em consequência, prevenir a DPE. Nas duas últimas décadas, muitos estudos

experimentais foram conduzidos com o objetivo de otimizar as técnicas de preservação pulmonar e reduzir o impacto da LIR na função pulmonar pós-transplante.

Devido a sua simplicidade técnica, o método de preservação pulmonar adotado pela maior parte dos centros em todo o mundo é a perfusão da artéria pulmonar com 50 a 60 ml/kg da solução de preservação a 4 °C. Os pulmões são insuflados com uma pressão de 15 a 20 cmH₂O e uma fração inspirada de oxigênio (FiO₂) menor que 50%, sendo armazenados em uma temperatura de 4 °C¹⁵. A perfusão anterógrada da artéria pulmonar tem por objetivo resfriar uniformemente o tecido e remover o sangue do leito vascular pulmonar. A perfusão previne trombose vascular e garante o resfriamento homogêneo de todo o pulmão, reduzindo a lesão celular causada por macrófagos e neutrófilos retidos.

Durante muitos anos, as soluções do tipo intracelular (alta concentração de K⁺ e baixa concentração de Na⁺) foram usadas por praticamente todos os serviços de transplante pulmonar do mundo. As suas principais representantes eram a solução Euro-Collins, desenvolvida originalmente para a preservação de rins, e a solução da Universidade de Wisconsin, desenvolvida para o transplante hepático¹⁵. Com o passar do tempo, a alta concentração de K⁺ dessas soluções mostrou-se extremamente deletéria para o endotélio dos vasos pulmonares, e vários estudos experimentais comprovaram a superioridade das soluções do tipo extracelular (baixa concentração de K⁺ e alta concentração de Na⁺) para a preservação pulmonar. A solução *Low-Potassium Dextran Glucose* (LPD-G)

é a única desenvolvida especificamente para a preservação dos pulmões. O uso da LPD-G aumentou a tolerância dos pulmões, estendendo com segurança o tempo de isquemia para 6 a 8 horas; alguns centros têm realizado transplantes com tempo de isquemia de 10 a 12 horas. Dessa forma, a LPD-G, comercializada com o nome Perfadex® (Vitrolife; Gotenburgo, Suécia), tornou-se a solução de preservação de escolha no transplante pulmonar, sendo a mais usada em todo o mundo¹⁶.

O uso de Perfadex® é rotineiro no grupo de transplante pulmonar do InCor, onde também foram evidenciadas as vantagens desse perfusato¹⁷. Contudo, o seu preço elevado e as dificuldades logísticas ocasionadas pelas vicissitudes burocráticas do sistema aduaneiro dos portos e aeroportos brasileiros com relação a materiais médico-hospitalares de alto custo têm levado o grupo a freqüentes dificuldades com o prosseguimento do Programa de Transplante Pulmonar. Este já precisou ser suspenso temporariamente devido a problemas burocráticos relacionados à importação desses materiais. Esses mesmos entraves também podem dificultar a abertura de novos centros nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Desta forma, a necessidade de uma solução de preservação produzida no Brasil fica premente, no intuito de reduzir custos e solucionar os citados problemas, permitindo a manutenção dos serviços de transplante pulmonar que já existem, bem como facilitando a abertura de novos centros.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi comparar duas soluções de preservação pulmonar, analisando os efeitos da lesão de isquemia-reperfusão em um modelo de avaliação pulmonar *ex vivo*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Histórico da preservação pulmonar

A remoção de um órgão do corpo humano cria uma injúria isquêmica cuja seqüela pode resultar em disfunção temporária ou permanente do órgão após o implante. Essa disfunção pode ser tolerada no transplante renal, devido à existência de alternativas como a diálise, mas pode ser desastrosa no transplante pulmonar. O papel da preservação pulmonar é o de minimizar os efeitos da isquemia, mantendo a integridade funcional e morfológica do pulmão, resultando em uma função pulmonar otimizada após o implante.

Estudos preliminares em cães revelaram que o grau de lesão pulmonar era dependente da duração da isquemia. Os pulmões toleravam mal períodos superiores a 90 minutos de isquemia normotérmica¹⁴. Aican et al.* *apud* Kelly¹⁴ confirmaram isso em um modelo canino de autotransplante pulmonar bilateral, no qual os pulmões submetidos a mais de uma hora de isquemia “quente” evoluíam com disfunção severa. Em virtude dessas evidências experimentais, os primeiros transplantes pulmonares em humanos foram realizados com o mínimo de tempo de isquemia, ou seja, o doador era transportado até o hospital onde ia ser realizado o transplante, e os dois procedimentos eram feitos simultaneamente em salas vizinhas, de

* Aican F, Cayirli M, Isin E, Hardy JD. One stage reimplantation of both lungs in the dog. JAMA. 1971; 215: 1301-6.

modo que o pulmão pudesse ser implantado minutos após a remoção¹⁸. Assim aconteceu na Universidade de Toronto, em 1983, quando foi realizado o primeiro transplante pulmonar unilateral bem-sucedido⁴.

Essa metodologia, entretanto, estava associada a uma série de problemas: a transferência do doador para outro centro podia complicar o processo de doação, uma vez que a família muitas vezes aceitava a retirada dos órgãos, mas não o transporte do corpo; além disso, havia muitas dificuldades logísticas com esse transporte, incluindo o maior risco de deterioração do quadro do doador, comprometendo a captação dos outros órgãos, como fígado e rins. Na década de 1980, o transplante pulmonar tornou-se uma terapia efetiva para pacientes com pneumopatias em estágio avançado. A escassez de doadores, entretanto, limitou o número de transplantes. Isso estimulou o desenvolvimento de técnicas de preservação que pudessem aumentar a tolerância dos pulmões a períodos mais longos de isquemia, de modo que pudessem ser utilizados pulmões de doadores de outros centros mais distantes.

A hipotermia, usada para diminuir o metabolismo celular, é a base da maioria dos métodos de preservação pulmonar.

O **resfriamento tópico** ou a **simples imersão hipotérmica** do pulmão foi o método de preservação usado pelo grupo de Toronto nos seus primeiros casos de transplante pulmonar⁵, o que possibilitou tempos de isquemia de até 5 horas. Essa escolha estava baseada em estudos experimentais da década de 1960, que mostravam que o resfriamento dos

pulmões isquêmicos resultava em melhor função pulmonar após o transplante¹⁹.

A **autoperfusão normotérmica do bloco coração-pulmão** foi descrita primeiramente por Martin e Starling, no início do século XX, para estudos de fisiologia; na década de 1960, a técnica foi adaptada por Robicsek para ser usada como um método de preservação no transplante cardíaco¹⁹. O grupo de Pittsburgh adquiriu a maior experiência clínica com a autoperfusão normotérmica em seu programa de transplante cardio-pulmonar, obtendo bons resultados com períodos de isquemia de 4 a 6 horas²⁰. Eles desenvolveram, no início da década de 1980, um contêiner estéril para transporte do bloco coração-pulmão. Os pulmões eram manualmente ventilados através de cânula colocada na traquéia. Cânulas na veia cava superior e na aorta serviam para entrada e saída de sangue do doador, armazenado em um saco coletor, bombeado pelo próprio coração. A esperança que o método pudesse estender os tempos de isquemia não se concretizou, pois períodos prolongados de autoperfusão causavam hipertensão pulmonar e falência do enxerto¹⁹. Por não ter vantagens em relação a outras técnicas de preservação, e devido à sua complexidade e às dificuldades logísticas de sua aplicação, o método foi abandonado.

O **resfriamento do doador em circulação extracorpórea (CEC)** foi um método de preservação usado por alguns grupos, destacando-se o grupo de transplante cardio-pulmonar do *Harefield Hospital* (Inglaterra), que descreveram vários casos de preservação pulmonar satisfatória com até 4 horas de isquemia²¹. Consistia em colocar o doador em CEC (uma cânula na

aorta ascendente e outra cânula no átrio direito) e resfriá-lo até 10 °C. O problema do método era a sua complexidade, que incluía a necessidade de um dispositivo de CEC e perfusionista treinado. Além disso, o resfriamento dos pulmões era lento, já que durante a CEC, o fluxo sanguíneo dos pulmões só ocorria através das artérias brônquicas.

A **perfusão anterógrada da artéria pulmonar (*single flush perfusion*)** é o método mais usado atualmente em todo o mundo. Consiste na infusão de aproximadamente 60 ml/kg de uma solução de preservação a 4 °C através de uma cânula introduzida no tronco da artéria pulmonar. Esta técnica foi descrita pela primeira vez por White et al.* em 1966 *apud* Egan¹⁸. Collins et al.²² e Sack et al.²³ mostraram que o método de preservação baseado na perfusão do órgão (*single-flush*) era capaz de proteger rins da injúria de isquemia por até 72 horas. A possibilidade de que esse método funcionasse para preservação pulmonar foi confirmada nos trabalhos de Grosjean et al.** e Kondo et al.*** *apud* Hakim²⁴. Apoiados por essas evidências, e por seus próprios trabalhos experimentais em primatas, o grupo de Stanford usou a perfusão da artéria pulmonar com a solução Euro-Collins no seu pioneiro Programa de Transplante Coração-Pulmão, no início da década de 1980, obtendo excelentes resultados²⁵.

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

** Grosjean O, Noirclerc M, Duvinage JF, et al. Pulmonary transplantation with immediate return of function after twenty-four hours of preservation. *Acta Chir Belg.* 1972; 71: 321-33.

*** Kondo Y, Turner MD, Cockrell JV, Hardy JD. Ischemic tolerance of the canine allotransplanted lung. *Surgery.* 1974; 76: 447-53.

A vantagem da técnica é a sua simplicidade e facilidade de execução, permitindo um resfriamento rápido, eficiente e uniforme dos pulmões. Locke et al. compararam a técnica de resfriamento tópico com a perfusão da artéria pulmonar com Euro-Collins em um modelo de alotransplante pulmonar unilateral em cães, após 6 horas de isquemia. Concluíram que a perfusão com Euro-Collins produz um resfriamento mais rápido e eficiente, resultando em excelente desempenho pulmonar (melhor capacidade de oxigenação, menos edema)²⁶.

Muitas soluções de preservação têm sido testadas nos últimos 30 anos como veremos no próximo capítulo. Entretanto, independente do tipo de perfusato, a maioria dos centros administra prostaglandina E1 (PGE1) juntamente com a solução. Como é um potente vasodilatador, esta droga reverte a vasoconstrição causada pela hipotermia e pela elevada concentração de potássio de algumas soluções, possibilitando uma distribuição mais uniforme do perfusato nos pulmões. Mesmo com o uso mais difundido das soluções do tipo extracelular, com uma menor concentração de potássio, a PGE1 continua a ser usada como um aditivo à solução de preservação. Isso porque vários estudos experimentais mostraram que o seu benefício não resulta apenas do efeito vasodilatador, mas de suas propriedades anti-inflamatórias. Ao atuar na elevação dos níveis de cAMP (*cyclic adenosine 3',5'-monophosphate*), a PGE1 é capaz de reduzir a migração e ativação de neutrófilos, bem como a agregação plaquetária, preservando a integridade da barreira endotelial.

3.2 Soluções de preservação pulmonar

As soluções de preservação são elaboradas para reduzir a injúria de isquemia através de alguns mecanismos: reduzir o edema intracelular e extracelular; prevenir a acidose intracelular; minimizar o estresse oxidativo (radicais livres de oxigênio); restaurar o metabolismo intracelular (compostos de fosfato de alta energia); evitar o acúmulo intracelular de cálcio. Colóides, hidroxietilamido e dextran são usados para prevenir a passagem do perfusato para o espaço intersticial. Substâncias impermeáveis como rafinose, manitol, lactobionato e gluconato são usadas para evitar o edema intracelular, já que entram no espaço intersticial, mas não atravessam a membrana celular. Tampões como fosfato, histidina e bicarbonato são usados para reverter a acidose causada pela glicólise anaeróbica durante a isquemia. Alopurinol e glutathione são os anti-oxidantes mais usados. Adenosina, ribose e fosfatos inorgânicos servem como substratos para a síntese de adenosina trifosfato (ATP) que ocorre após a reperfusão.

Os primeiros estudos sobre preservação pulmonar mostravam uma função pulmonar insatisfatória quando o perfusato utilizado tinha uma composição extracelular (cristalóides), como a solução salina fisiológica ou Ringer lactato^{18,27,28}. Na década de 1980, a maioria dos centros passou a usar soluções do tipo intracelular ($\uparrow K^+$, $\downarrow Na^+$), principalmente a solução Euro-Collins (EC). Esta foi desenvolvida originalmente para preservação renal, com base no princípio de que durante o período de isquemia há perda da função da Na^+/K^+ -ATPase ao nível celular. Por ter a mesma composição

eletrolítica da célula, ela reduz o gradiente iônico transmembrana, minimizando o influxo de sódio e a saída de potássio, prevenindo o edema celular. A EC mostrou-se capaz de preservar a função pulmonar com até 6 horas de isquemia fria²⁹. A solução Universidade de Wisconsin (UW), também do tipo intracelular, foi criada na década de 1980 para o transplante hepático. Alguns estudos em modelos animais demonstraram que a UW era superior a EC na preservação pulmonar^{30,31}, possivelmente devido à presença de aditivos como lactobionato, glutatona e rafinose. Apesar dessas supostas vantagens, a UW não foi capaz de prolongar significativamente o tempo de isquemia na prática clínica. A dificuldade em obter melhores resultados com as soluções intracelulares pode ser explicada pela sua alta concentração de potássio. Sabe-se que a hipercalemia despolariza as membranas celulares da musculatura lisa, aumentando o tônus vascular^{32,33}. Dessa forma, a grande quantidade de potássio nas soluções EC e UW provoca vasoconstrição na circulação pulmonar. Isso resulta em uma má distribuição do perfusato nos pulmões, uma preservação insatisfatória e, conseqüentemente, uma função pulmonar ruim após o transplante. Estudos experimentais envolvendo cultura celular mostraram que a alta concentração de potássio afeta diretamente a função da célula endotelial e causa lesão ao pneumócito tipo II^{34,35}.

A idéia de usar uma solução extracelular ($\downarrow K^+$, $\uparrow Na^+$) modificada para preservação pulmonar foi desenvolvida no Japão em meados da década de 1980. Fujimura et al. demonstraram, em um modelo de transplante pulmonar unilateral em cães, que uma solução extracelular modificada (contendo

dextran, para aumentar a pressão oncótica do perfusato, e fosfato – HPO_4^- – como tampão) era superior à solução EC para preservação pulmonar prolongada (48 horas)³⁶. Posteriormente, Keshavjee et al. mostraram que o uso da solução *low-potassium-dextran* (LPD) resultava em uma melhor função pulmonar do que a solução EC após 12 horas de isquemia fria em um modelo de transplante pulmonar unilateral em cães³⁷. Em estudo usando cultura de pneumócitos tipo II de ratos, expostos a EC ou LPD, Maccherini et al. concluíram que a solução LPD é menos citotóxica do que EC, além de possibilitar níveis mais altos de atividade metabólica nas células epiteliais alveolares³⁵.

Em outro estudo com transplante pulmonar em cães, Keshavjee et al. analisaram separadamente o papel da baixa concentração de potássio (*low-potassium*) e do dextran, e demonstraram que ambos contribuem significativamente para a boa performance do LPD na preservação pulmonar³⁸. A baixa concentração de potássio é menos prejudicial à integridade estrutural e funcional das células endoteliais. Dextran 40 é uma macromolécula com um peso molecular de 40 000 D, exercendo uma pressão oncótica de 24 mmHg quando diluída em uma concentração de 5%. Além disso, o dextran melhora a capacidade de deformação das hemácias, prevenindo a agregação eritrocitária, e forma um “revestimento” sobre a superfície das células endoteliais e plaquetas, exercendo, assim, um efeito antitrombótico, contribuindo para a preservação da microcirculação pulmonar³⁸.

No início dos anos 1990, Date et al. observaram que a glicose adicionada à solução LPD funcionava como um substrato para a manutenção do metabolismo aeróbico que ocorria nos pulmões insuflados³⁹. Com o uso da solução denominada LPD-Glicose, foi possível estender o período de isquemia, obtendo boa função pulmonar após 24 horas de isquemia em um modelo de transplante em cães. A nova solução foi aprovada para uso clínico e passou a ser comercializada com o nome Perfadex[®].

Steen et al. obtiveram excelente função pulmonar após preservação com Perfadex[®] em um modelo de transplante pulmonar unilateral em porcos e 24 horas de isquemia fria⁴⁰. Binns et al. também obtiveram uma função pulmonar superior com preservação pulmonar com LPD-Glicose comparada com EC, em pulmões de coelhos submetidos a 18 horas de isquemia fria e avaliados em um modelo de reperfusão *ex vivo*⁴¹. Mostraram também que a adição de sangue à solução LPD-Glicose não acrescentava nenhuma vantagem. Estudos experimentais comparando LPD-Glicose com soluções intracelulares (EC, UW), incluindo análise ultraestrutural e microscopia eletrônica, mostraram que aquela é capaz de reduzir a produção de radicais livres de oxigênio pelas células endoteliais⁴², limitar a perda de função e metabolismo do surfactante alveolar⁴³ e conservar melhor a integridade estrutural do pulmão⁴⁴. Uma melhor preservação estrutural nem sempre se traduziu em melhor função pulmonar após curtos períodos de isquemia; entretanto, após períodos mais longos (> 8 horas), pulmões preservados

com LPD-Glicose sempre mostraram uma melhor função do que aqueles preservados com soluções do tipo intracelular⁴⁵⁻⁴⁷.

Celsior, uma solução extracelular desenvolvida especificamente para o transplante cardíaco, obteve resultados satisfatórios para preservação pulmonar em estudos experimentais⁴⁸⁻⁵¹. Alguns mostraram inclusive resultados superiores do Celsior em relação ao LPD^{49,52,53}; isso pode ser explicado pela presença de glutatona, histidina e lactobionato na solução Celsior, antioxidantes que reduzem a injúria causada por radicais livres de oxigênio. No entanto, a maioria dos estudos mostrou que as duas soluções tem desempenho semelhante, mostrando melhores resultados para o LPD com tempos de isquemia mais longos (> 12 horas)^{49,54,55}.

De acordo com uma pesquisa mundial publicada em 1998, a solução de preservação pulmonar mais usada na prática clínica era a EC, em 77% dos centros, seguida pela UW, em 15%⁵⁶. Com os excelentes resultados obtidos nos estudos experimentais, o Perfadex[®] passou a ser a solução de preservação pulmonar adotada pela maior parte dos centros.

Estudos clínicos (retrospectivos) de sete centros foram publicados na última década comparando os efeitos da solução atualmente utilizada Perfadex[®], com um controle histórico de pulmões preservados com EC⁵⁷⁻⁶³. Em cinco estudos^{57-59,61,63}, os autores concluíram que a preservação pulmonar obtida com o Perfadex[®] era superior, uma vez que nesse grupo houve melhores índices de oxigenação no pós-operatório imediato, menor incidência de disfunção primária do enxerto, menor tempo de ventilação mecânica e UTI, além de uma tendência a uma menor mortalidade em 30

dias. Nos outros dois estudos^{60,62}, os resultados obtidos foram semelhantes nos grupos Perfadex[®] e EC. Em outro estudo clínico, Thabut et al. demonstraram que, após ajuste do tempo de isquemia por análise multivariada, o uso de soluções do tipo extracelular estava associado à redução da incidência de DPE quando comparado ao uso de soluções do tipo intracelular (não houve efeito na mortalidade em 30 dias)⁵⁰.

Em conclusão, há evidências clínicas e experimentais que sugerem que LPD-Glicose é a solução de preservação de escolha para o transplante pulmonar, razão pela qual ela é adotada pela maioria dos centros em todo o mundo, incluindo os centros brasileiros.

Recentemente, o Grupo de Transplante Pulmonar do InCor iniciou uma série de estudos com o objetivo de avaliar a solução LPD-G Nacional (Farmoterápica, São Paulo), uma solução de preservação pulmonar de composição química semelhante ao Perfadex[®]. O primeiro estudo publicado avaliou o desempenho da nova solução em um modelo experimental de isquemia-reperfusão com pulmões de ratos⁶⁴. Pulmões preservados com LPD-G Nacional tiveram uma capacidade de oxigenação semelhante ao Perfadex[®]. Porém, na análise de parâmetros de mecânica ventilatória e formação de edema, o desempenho da solução nacional foi inferior ao Perfadex[®]; essa diferença foi maior no grupo com 6 horas de isquemia fria, sendo menos evidente após 12 horas de isquemia.

3.3 Modelos experimentais para estudo da preservação pulmonar

3.3.1 Modelos animais

A pesquisa experimental no campo da preservação pulmonar sempre foi baseada em modelos animais. As espécies utilizadas e a estrutura dos modelos variam amplamente; a ausência de um modelo padronizado dificulta a comparação entre diferentes publicações.

Experimentos envolvendo animais de médio e grande porte são caros e consomem muito tempo. Cães foram usados durante muito tempo nas pesquisas sobre vários aspectos do transplante pulmonar. A pressão da opinião pública, particularmente das entidades de proteção aos animais, fez com que os modelos caninos fossem aos poucos sendo substituídos por outros, sendo o modelo suíno o mais usado atualmente. Em teoria, o transplante pulmonar bilateral seria o modelo ideal para estudo da preservação pulmonar, porém a mortalidade operatória é muito alta. A necessidade de circulação extracorpórea e a dificuldade técnica do procedimento comparado a outros métodos tornavam o transplante bilateral inadequado para uso rotineiro nas pesquisas experimentais. A maioria dos estudos de preservação pulmonar em grandes animais envolve o transplante unilateral. Entretanto, o transplante, isoladamente, não é um método aceitável, uma vez que permanece o pulmão normal contralateral. Este pode fazer com que a avaliação funcional e hemodinâmica seja normal, mesmo

que o pulmão transplantado tenha tido uma preservação insatisfatória. Por essa razão, é necessário realizar uma pneumonectomia ou ligadura da artéria pulmonar contralateral, fazendo com que o animal fique dependente da função do pulmão transplantado. O problema é que estes procedimentos estão associados à sobrecarga cardíaca, instabilidade hemodinâmica e alta mortalidade. Técnicas como o uso de *cuffs* colocados ao redor da artéria pulmonar e insuflados através de reservatórios implantados no subcutâneo permitem a oclusão temporária da artéria e a avaliação isolada do pulmão transplantado, com uma maior sobrevivência dos animais⁶⁵.

Experimentos com pequenos animais têm a vantagem de um menor custo, além de possibilitarem a realização de um grande número de casos em um intervalo menor de tempo. Por essa razão, esses modelos são usados para triagem de diferentes métodos de preservação pulmonar (técnicas, soluções, aditivos etc.), antes que possam ser aplicados em modelos mais complexos com animais de maior porte.

Modelos de transplante pulmonar *in vivo* em ratos são bem descritos na literatura. Medidas de débito cardíaco e resistência vascular pulmonar são difíceis nesse modelo; além disso, a variabilidade de técnicas de anastomose dificulta a reprodutibilidade do modelo em diferentes centros. A mortalidade é elevada exceto em centros onde a técnica é executada com muita frequência. Por esta razão, o modelo de perfusão pulmonar isolada em ratos ou coelhos ganhou popularidade nos centros que pesquisam preservação pulmonar. Através dele, é possível avaliar a função de pulmões submetidos a diferentes períodos de isquemia fria, sem a necessidade de

transplantá-los em outros animais. A técnica consiste na perfusão *ex vivo* do bloco pulmonar usando sangue venoso. Parâmetros fisiológicos (oxigenação, complacência, resistência vascular pulmonar) podem ser medidos, permitindo a comparação de diferentes técnicas ou soluções de preservação.

Diversos métodos de perfusão pulmonar *ex vivo* já foram relatados. Em um dos primeiros modelos, pulmões de coelhos eram ventilados e perfundidos com sangue venoso retirado de outros três ou quatro coelhos. Como não havia recirculação do sangue, isto é, o sangue oxigenado pelo bloco pulmonar não retornava ao circuito, a reperfusão e a avaliação pulmonar eram limitadas a um período de 10 minutos⁶⁶. Para resolver este problema, foram desenvolvidos sistemas de perfusão pulmonar *ex vivo*, nos quais um rato anestesiado era integrado ao sistema com a finalidade de fornecer sangue venoso continuamente ao circuito. Isso possibilitava um período maior de reperfusão pulmonar (60 minutos)⁶⁷. A maior dificuldade desses sistemas era manter a estabilidade do rato anestesiado durante todo o período de avaliação, obstáculo contornado com o emprego de oxigenadores de membrana, usados para “desoxigenar” o sangue do circuito. Isso simplificou o sistema, tornando-o mais estável e permitindo perfusões prolongadas. O modelo de perfusão *ex vivo* mais usado atualmente, o qual permite a aquisição de dados (parâmetros hemodinâmicos e de mecânica ventilatória) em tempo real e o seu armazenamento em computador, é comercializado com o nome *Isolated Perfused Rat or Guinea Pig Lung System* (Harvard Apparatus, Holliston, MA,

EUA; Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, Alemanha). O Laboratório de Investigação Médica (LIM 61) da Disciplina de Cirurgia Torácica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo utiliza o sistema de perfusão pulmonar *ex vivo* da Harvard na maioria de suas pesquisas envolvendo preservação pulmonar em ratos^{64,68}.

3.3.2 O modelo de perfusão *ex vivo* em pulmões humanos

A perfusão pulmonar *ex vivo* não é um conceito novo, sendo amplamente utilizada em estudos de fisiologia pulmonar em animais de pequeno e médio porte. Carrel e Lindbergh*, *apud* Cypel et al.⁶⁹, descreveram o conceito da “cultura de órgãos inteiros” em 1935. Porém, o desenvolvimento de máquinas de perfusão *ex vivo* de pulmões humanos esbarrava na instabilidade desses sistemas e na sua incapacidade de manter a integridade da barreira alvéolo-capilar, resultando em progressiva deterioração da circulação pulmonar, aumento da resistência vascular e edema. O aprimoramento dos circuitos de circulação extracorpórea e o desenvolvimento de novas soluções de perfusão foram responsáveis pelo “renascimento” da perfusão *ex vivo* de pulmões humanos no início do século XXI.

A perfusão pulmonar *ex vivo* (PPEV) foi usada pela primeira vez pelo grupo de pesquisadores da Universidade de Lund (Lund, Suécia) em 2000, quando foi realizado o primeiro transplante pulmonar de um doador em

* Carrel A, Lindbergh CA. The culture of whole organs. Science. 1935; 81: 621-3.

parada cardíaca⁷⁰. Tratava-se de um homem de 54 anos que sofreu parada cardíaca após um infarto agudo do miocárdio. Diante de um doador com coração parado a avaliação funcional dos pulmões tinha que ser feita através da PPEV. Após o resfriamento tópico dos pulmões, estes foram colocados no sistema de avaliação pulmonar *ex vivo*. Como a gasometria foi satisfatória, o pulmão foi transplantado com sucesso em uma paciente de 54 anos portadora de enfisema pulmonar.

O modelo de PPEV desenvolvido por Steen et al.⁷¹ consistia em uma caixa rígida e transparente, para suporte do bloco pulmonar, um conjunto de tubos e conexões, uma bomba centrífuga, um trocador de calor e um oxigenador de membranas, além de filtro leucocitário, fluxômetro e termômetro. Este sistema era preenchido com 1500 ml de uma solução desenvolvida pelo grupo de Steen em parceria com a empresa Vitrolife AB (Steen Solution[®], Vitrolife; Gothenburg, Suécia), misturada com concentrados de hemácias, resultando em um perfusato com um hematócrito em torno de 15%. A Steen Solution[®] é uma solução de composição eletrolítica extracelular, contendo albumina e dextran, que conferem uma alta pressão oncótica à solução. Além disso, o dextran tem propriedades antitrombóticas e reveste a superfície endotelial da circulação pulmonar e dos tubos do circuito. Uma mistura de gases (nitrogênio, oxigênio e dióxido de carbono) era administrada ao sistema através do oxigenador de membranas, e seu fluxo era ajustado de forma a obter uma concentração gasométrica semelhante ao sangue venoso. O fluxo e a temperatura eram gradualmente aumentados, e a pressão de artéria

pulmonar era rigorosamente monitorizada, nunca ultrapassando 20 mmHg. Quando a temperatura atingia 32 °C, a ventilação era iniciada. A avaliação era feita através da gasometria do perfusato que saía pela veias pulmonares, quando a temperatura atingia 37 °C.

O modelo de PPEV descrito por Steen permitia a avaliação pulmonar *ex vivo* sem a formação de edema. Isso era possível graças a alta pressão oncótica da solução, associada a uma perfusão normotérmica rigorosamente controlada. Sabe-se que uma perfusão fria provoca elevação da resistência vascular pulmonar; além disso, uma reperfusão com fluxos altos e sem controle acarreta trauma mecânico na microvasculatura pulmonar por aumento da pressão hidrostática, contribuindo para a formação de edema.

Posteriormente, a PPEV passou a ser usada para avaliação e recondicionamento de pulmões “marginais”, isto é, pulmões considerados inadequados para o transplante^{72,73}. A capacidade da PPEV de melhorar a qualidade desses pulmões possibilitando o seu uso para transplante era explicado por vários fatores: o sistema permitia a cuidadosa inspeção dos pulmões, bem como manobras de recrutamento para expansão de áreas atelectasiadas; permitia também uma limpeza mais efetiva das secreções brônquicas e remoção dos coágulos da circulação pulmonar; todo o volume e pressão da ventilação eram distribuídos para os pulmões, sem a interferência da caixa torácica e diafragma, melhorando a relação ventilação/perfusão⁷⁴. Em maio de 2005, o grupo da Universidade de Lund realizou o primeiro transplante pulmonar usando um pulmão inicialmente rejeitado e, posteriormente, recondicionado através da PPEV⁷⁵. O sucesso

inicial estimulou a continuidade do uso clínico da PPEV. Em 2009, o mesmo grupo publicou uma pequena série de seis pacientes transplantados com pulmões recondicionados *ex vivo*, com uma sobrevida de 100% em três meses e 67% em dois anos⁷⁶. Em 2010, o grupo de Toronto divulgou os resultados de 16 pacientes transplantados com pulmões submetidos a PPEV: não houve mortalidade em 30 dias e a incidência de disfunção primária do enxerto foi semelhante aos pacientes transplantados normalmente (sem PPEV) no mesmo período⁷⁷.

Na Universidade de Toronto, Cypel et al. fizeram algumas modificações na metodologia da PPEV, de forma a prolongar o tempo de perfusão *ex vivo* por até 12 horas, obtendo uma nova estratégia de manutenção protetora dos pulmões doados⁷⁸. Estudos experimentais mostraram que pulmões preservados por 12 horas em isquemia fria e mantidos por mais 12 horas em perfusão normotérmica *ex vivo* tiveram um melhor desempenho após o transplante (com menor formação de edema) comparados a pulmões preservados por 24 horas em isquemia fria⁶⁹. Isso mostrava que a PPEV podia reduzir a injúria de isquemia, permitindo com que os pulmões ficassem metabolicamente ativos, acelerando sua recuperação. Dentre as modificações feitas para aumentar o tempo de PPEV, estão o uso de um perfusato acelular, ou seja, somente Steen Solution[®] sem a adição das hemácias, e a perfusão com baixo fluxo (aproximadamente 40% do débito cardíaco estimado), mantendo a pressão de artéria pulmonar entre 10 e 15 mmHg⁷⁸. O uso de um perfusato acelular não compromete a oxigenação das células pulmonares, uma vez que este é fornecido pela ventilação e se

difunde através das vias aéreas, além de evitar os prejuízos causados pelo trauma mecânico sofrido pelas hemácias circulando no sistema (hemólise).

A PPEV é uma realidade em vários centros de transplante pulmonar no mundo, incluindo no InCor (HCFMUSP), que já publicou sua experiência inicial com a metodologia⁷⁹⁻⁸¹, oferecendo a possibilidade de estudar os efeitos da lesão de isquemia-reperfusão em pulmões humanos. Por essa razão, esse foi o método escolhido para comparar os efeitos de soluções de preservação pulmonar em nosso estudo.

4 MÉTODOS

Para a pesquisa, foram utilizados pulmões humanos de doadores em morte encefálica, que estivessem nos hospitais onde atuam as Organizações de Procura de Órgãos (OPO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Após a confirmação da morte encefálica do paciente, a Central de Transplantes do Estado de São Paulo notificava as equipes de captação de órgãos e tecidos. Se os pulmões doados fossem recusados pelas equipes de transplante pulmonar, eles eram disponibilizados para a pesquisa, mediante autorização dos familiares do doador.

O estudo (Protocolo de Pesquisa nº 0781/07) foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HCFMUSP em sessão de 12 de setembro de 2007 (Anexo 1), inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2). Este foi assinado pelo responsável pelo doador em todos os casos.

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de uma pesquisa experimental, controlada e randomizada. A intervenção aplicada consistia na perfusão de pulmões doados para transplante com uma solução de preservação pulmonar, chamada por nós de LPD-G nacional, produzida pela empresa Farmoterápica (São Paulo, Brasil). Trata-se de uma solução de composição idêntica ao Perfadex[®]. Como o período de validade da patente do mesmo já expirou, não há qualquer problema legal na sua reprodução. No grupo controle, a perfusão pulmonar era feita com a solução de preservação usada habitualmente na prática clínica: Perfadex[®], produzida e comercializada pela Vitrolife (Göteborg, Suécia). A qualidade da preservação dos pulmões captados nos dois grupos foi avaliada após 10 horas de isquemia fria e 60 minutos de reperfusão em um modelo de avaliação pulmonar *ex vivo*. Embora o tempo médio de isquemia fria na prática clínica seja de 6 a 8 horas, nós optamos por adotar um tempo maior, de forma a aumentar a injúria de isquemia e avaliar melhor a qualidade das soluções de preservação. O período de 10 horas nos pareceu satisfatório já que alguns casos de transplante bilateral em nossa prática ocorrem com tempo de isquemia fria de 10 horas. As variáveis de desfecho foram definidas na avaliação funcional, hemodinâmica e histológica conforme detalhado na última seção deste capítulo.

As hipóteses formuladas para a pesquisa foram as seguintes:

Hipótese nula: a qualidade da preservação pulmonar é a mesma com o uso de Perfadex[®] e LPD-G nacional.

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

Trata-se de um estudo de equivalência já que a meta é mostrar que a nova solução é tão eficaz quanto o Perfadex[®]. Planejar o tamanho da amostra neste caso implicaria em delinear o estudo de forma que tivesse poder substancial ($\beta < 0,1$) para rejeitar a hipótese nula quando a magnitude de efeito fosse muito pequena e, portanto, clinicamente insignificante (p. ex., uma diferença de 5 mmHg na média da PaO₂). Isso resultaria em uma amostra muito grande, inviabilizando uma pesquisa que envolve a captação de pulmões humanos. O cálculo da amostra foi baseado em estudos experimentais previamente publicados, envolvendo comparação de soluções de preservação pulmonar com modelos de transplante pulmonar experimental em cães e porcos.

Os casos foram designados aleatoriamente (usando um algoritmo computadorizado) em um dos dois grupos:

(1) Grupo LPD-G nacional: oito blocos pulmonares extraídos e preservados pela perfusão com a solução LPD-G nacional.

(2) Grupo Perfadex[®]: oito blocos pulmonares extraídos e preservados pela perfusão com a solução Perfadex[®].

A seleção dos casos ocorreu no período de abril de 2009 a abril de 2010 e seguiu os seguintes critérios de inclusão:

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

- Pacientes internados nos hospitais em que atuam a OPO do HCFMUSP e a OPO da Santa Casa de São Paulo;
- Doadores cujos pulmões foram recusados pelas equipes de transplante pulmonar, mas que seriam submetidos a procedimento cirúrgico para captação de outros órgãos e tecidos;
- Doadores cujos familiares assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 Procedimentos

4.2.1 Captação Pulmonar

A técnica usada na pesquisa foi exatamente a mesma usada na prática clínica pela equipe de transplante pulmonar do InCor - HCFMUSP.

O doador era posicionado em decúbito dorsal horizontal com um coxim sob as escápulas. Após a preparação anestésica habitual (cateterismo da artéria radial, acesso venoso central etc.), realizava-se a esternotomia mediana com abertura do pericárdio e das pleuras mediastinais, seguida da dissecação e reparo das veias cavas superior e inferior. A dissecação da janela aorto-pulmonar era realizada com a liberação do plano posterior entre a aorta e a artéria pulmonar direita, permitindo a colocação de pinça hemostática na aorta. Uma sutura em bolsa era feita com fio de polipropileno 4-0 no tronco pulmonar, através da qual era introduzida uma cânula arterial aramada ponta curva (80°) de 18 Fr (Braile Biomédica, São José do Rio

Preto, Brasil) para perfusão com a solução de preservação. Um fragmento do lobo médio era retirado para análise histológica posterior. A solução de preservação (Perfadex[®] ou LPD-G nacional) era “ativada” pela adição de 2,5 ml de bicarbonato de sódio 10 % e 0,6 ml de cloreto de cálcio (100 mg/ml) em cada litro da solução.

Após a administração endovenosa de heparina (300 U/kg), procedia-se à ligadura da veia cava superior, secção da veia cava inferior logo acima do diafragma e pinçamento da aorta torácica. Neste momento, iniciava-se a perfusão da artéria pulmonar com 50 ml/kg da solução de preservação a 4 °C. A aurícula esquerda era aberta para que ocorresse a drenagem da solução de preservação. Solução salina gelada era colocada nas cavidades pleurais para o resfriamento dos pulmões, enquanto todo o sangue do doador era aspirado. Durante a perfusão, os pulmões eram ventilados, de modo a evitar atelectasias e permitir uma distribuição mais homogênea da solução de preservação. A duração da perfusão era registrada.

Terminada a perfusão, a cânula era retirada e a extração pulmonar iniciada. As veias pulmonares eram seccionadas e separadas do átrio esquerdo. A veia cava superior era seccionada logo abaixo da ligadura, liberando-a da artéria pulmonar direita. A aorta ascendente era seccionada, o tronco pulmonar amputado antes da sua bifurcação e o coração era retirado. Iniciava-se a liberação dos pulmões através dos ligamentos pulmonares. Gentilmente, liberava-se todo o tecido mediastinal anterior ao esôfago até três ou quatro anéis acima da carina. Procedíamos à retirada em bloco dos pulmões, incluindo todo o pericárdio e estruturas adjacentes.

Liberados os pulmões e dissecada a traquéia distal, esta era clampeada com os pulmões insuflados, sendo o bloco retirado do campo operatório.

Os pulmões eram pesados, armazenados em saco estéril, imersos em solução salina gelada e transportados em caixa térmica preenchida com gelo. O bloco permanecia por 10 horas em isquemia fria (4 °C)

4.2.2 Avaliação Pulmonar *Ex Vivo*

Após o período de isquemia fria, os pulmões eram pesados e um novo fragmento era retirado do lobo médio para análise histológica. A reperfusão era iniciada em um modelo desenvolvido para a perfusão e avaliação pulmonar *ex vivo*.

O sistema de perfusão pulmonar *ex vivo* (Figura 1) assemelhava-se ao circuito montado em cirurgias cardiovasculares para circulação extracorpórea. Era composto por um conjunto de tubos, reservatório de sangue venoso neonatal (450 ml), oxigenador de membrana pediátrico, trocador de calor e bomba centrífuga (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, Brasil).



Figura 1. O sistema de perfusão pulmonar ex vivo: conjunto de tubos para circulação extracorpórea, bomba centrífuga, reservatório venoso e oxigenador de membranas. Nota-se ao fundo da imagem o bloco pulmonar na XVIVO[®] Chamber.

O bloco pulmonar era colocado sobre um suporte rígido e transparente (XVIVO[®] Chamber; Vitrolife, Göteborg, Suécia) que podia ser fechado para diminuir a perda de calor (Figura 2). Uma cânula era colocada no tronco da artéria pulmonar e fixada com uma sutura de polipropileno 4-0. Esta cânula tinha embutido um cateter (Figuras 3 e 4) para acoplamento em um transdutor de pressão TruWave (Edwards Lifesciences, Irvine, EUA), possibilitando monitorização contínua (Figura 4) da pressão de artéria pulmonar (PAP). Um tubo orotraqueal (n^o 8) era introduzido na traquéia e

amarrado com fita cardíaca (Figura 3). O oxigenador de membrana estava ligado a um misturador de gases MGB-1 (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, Brasil), o qual era conectado a dois cilindros: um contendo oxigênio e outro contendo uma mistura de nitrogênio (93 %) e gás carbônico (7 %). Quando essa mistura era aplicada ao oxigenador de membrana, este funcionava como um “desoxigenador”, de modo que o perfusato que entrava na artéria pulmonar ficasse com uma concentração de gases semelhante a do sangue venoso.

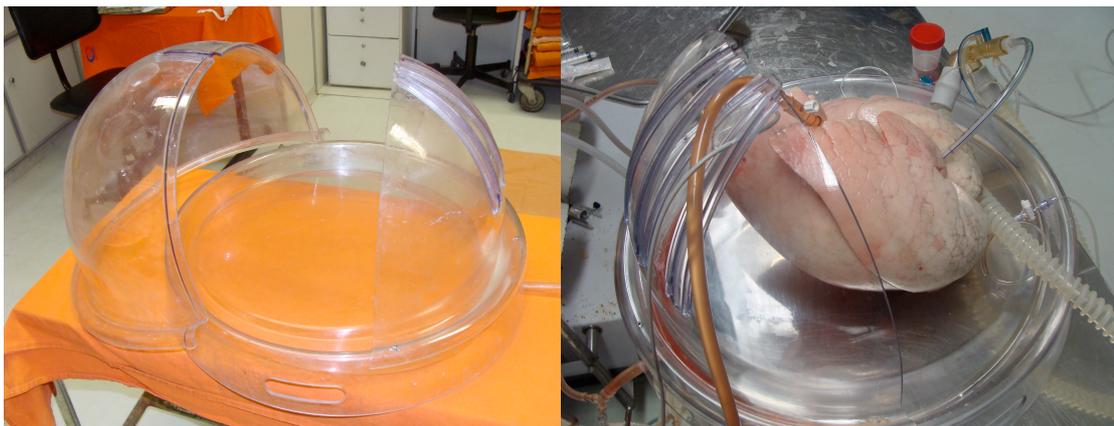


Figura 2. Caixa para suporte do bloco pulmonar (XVIVO[®] Chamber) no sistema de perfusão pulmonar *ex vivo*.

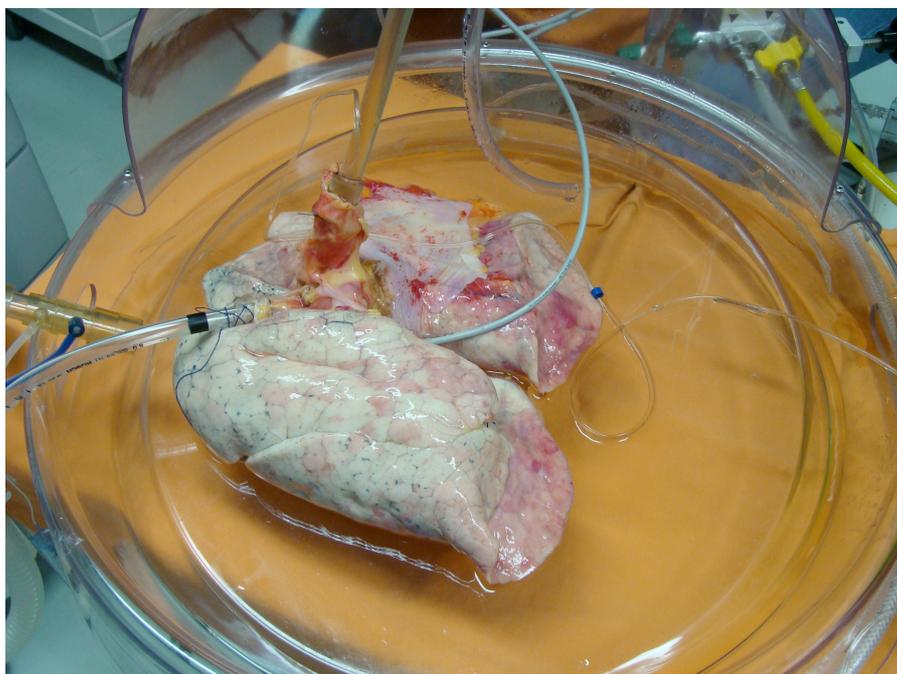


Figura 3. Tubo orotraqueal introduzido na traquéia e cânula acoplada ao tronco da artéria pulmonar.

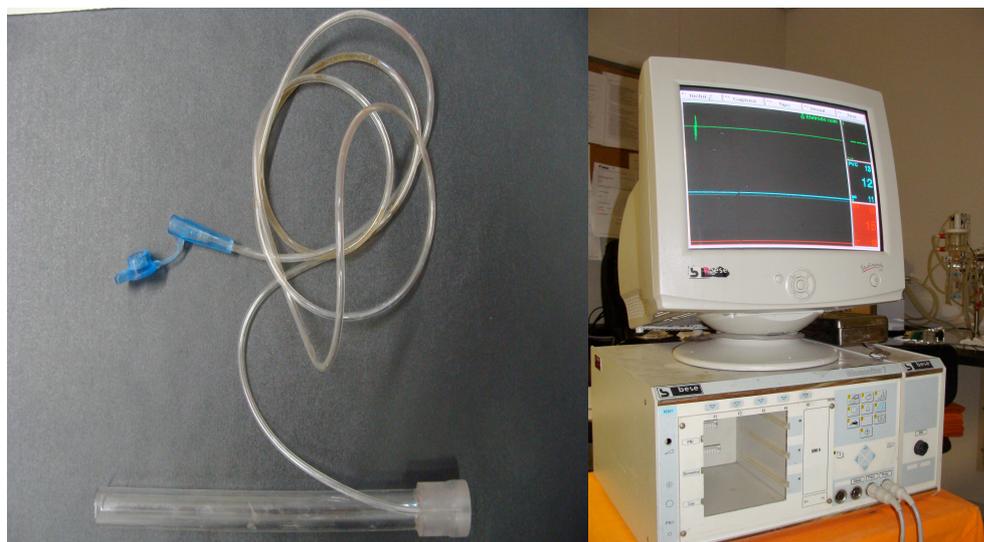


Figura 4. Detalhe da cânula introduzida no tronco da artéria pulmonar (à esquerda). A sonda embutida na cânula era conectada a um transdutor de pressão permitindo a monitorização contínua da pressão de artéria pulmonar (à direita).

O sistema era preenchido com 1500 ml de Steen Solution[®] (Vitrolife, Göteborg, Suécia), uma solução de composição eletrolítica extracelular contendo albumina e dextran, desenvolvida para a perfusão pulmonar *ex vivo*. Sua alta pressão oncótica possibilita várias horas de perfusão contínua sem a formação de edema.

A bomba centrífuga era ligada com um fluxo baixo (100 ml/min), o ar era removido do sistema e o circuito era, então, conectado à cânula da artéria pulmonar. A drenagem das veias pulmonares fluía diretamente para a XVIVO[®] Chamber, a qual era conectada ao circuito. O misturador de gases era ajustado em 35%. Uma amostra do perfusato era colhida neste momento para análise em um aparelho de gasometria (ABL 800; Radiometer, Copenhagen, Dinamarca). O fluxo do misturador, inicialmente em 0,5 l/min, era ajustado para manter a PaCO₂ entre 30 e 35 mmHg. O pH era mantido em níveis fisiológicos pela adição de 1 ml de trometamol (Addex-THAM[®]; Fresenius-Kabi, Uppsala, Suécia) para cada 1 mmol negativo do *base excess*.

O fluxo era elevado gradualmente (Tabela 1) até atingir o fluxo máximo, calculado como 40% do débito cardíaco estimado. Este era determinado a partir do tamanho do doador: três vezes a área de superfície corpórea (considerando o índice cardíaco de 3 l/min/m²). Durante todo o processo, a PAP era monitorizada e mantida abaixo de 20 mmHg, a fim de minimizar a formação de edema. Se a PAP atingisse 20 mmHg antes do fluxo máximo calculado, a elevação deste era interrompida e o valor anotado como o fluxo alcançado.

A temperatura também era continuamente monitorizada através de um sensor retal de temperatura (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, Brasil) colocado em uma das veias pulmonares e conectado ao termômetro clínico digital AG-2000 (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, Brasil). A temperatura era elevada lentamente até atingir a normotermia (37 °C) aos 30 minutos de reperfusão (Tabela 1).

Tabela 1. Estratégia para execução da perfusão pulmonar *ex vivo*

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

Quando a temperatura atingia 32 °C (em torno de 20 min de reperfusão), a ventilação era iniciada e o misturador de gases ajustado para 21%. Com isso, o oxigenador de membrana recebia somente a mistura de nitrogênio e gás carbônico, passando a atuar como um “desoxigenador”. O tubo orotraqueal era conectado a um ventilador (Fuji; Takaoka, São Bernardo do Campo, Brasil) com os seguintes ajustes iniciais: volume corrente de 6 ml/kg, frequência de 7/min, PEEP de 5 cmH₂O e FiO₂ de 100 %. O volume corrente era elevado gradualmente até 8 ml/kg.

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

4.3 Variáveis do estudo

4.3.1 Fluxo de perfusão

Foi registrado o tempo para a perfusão de todo o volume da solução de preservação durante a captação. Definiu-se a variável fluxo de perfusão da solução de preservação (F_p) como a razão entre o volume administrado e o tempo gasto para administrá-lo.

$$F_p \text{ (ml/min)} = \text{volume perfundido (ml)} / \text{tempo de perfusão (min)}$$

4.3.2 Variação do peso

O bloco pulmonar foi pesado em três momentos: logo depois da captação, após 10 horas de isquemia fria e ao final da reperfusão no modelo de avaliação pulmonar *ex vivo*. Tais medidas geraram duas variáveis: a

variação de peso pós-isquemia (ΔPi) e a variação de peso pós-reperfusão (ΔPr).

$$\Delta Pi (g) = \text{peso após isquemia (g)} - \text{peso após captação (g)}$$

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

4.3.3 Avaliação funcional

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

$$\Delta PO_2 (mmHg) = PaO_2 (mmHg) - PvO_2 (mmHg)$$

4.3.4 Avaliação hemodinâmica

A PAP era continuamente monitorizada. Quando o sistema atingiu a estabilidade (após 60 minutos de reperfusão), a PAP e o fluxo máximo atingido foram registrados para o cálculo da resistência vascular pulmonar (RVP) conforme fórmula abaixo.

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

4.3.5 Avaliação ventilatória

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

$$CP \text{ (ml/cmH}_2\text{O)} = V_c \text{ (ml)} / P_p \text{ (cmH}_2\text{O)} - PEEP \text{ (cmH}_2\text{O)}$$

4.3.6 Razão peso úmido-peso seco

Um parâmetro comumente usado para avaliação do edema pulmonar é a razão entre o peso da peça após a reperfusão e o peso após secagem em estufa. Para esta medida, 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).

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

4.3.7 Avaliação histológica

Como mencionado anteriormente, foram retirados fragmentos do lobo médio em três momentos. A primeira biópsia foi feita durante a captação, para avaliação e comparação da condição inicial dos pulmões estudados. A segunda biópsia foi feita após 10 horas de isquemia fria, e a terceira, depois de 60 minutos de reperfusão no modelo de avaliação pulmonar *ex vivo*.

Os fragmentos de pulmão foram imersos em formalina tamponada a 10% para fixação. Após 24 horas, foram confeccionados blocos de parafina com as amostras, os quais foram seccionados em cortes de 5 μ m e corados com hematoxilina-eosina. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz por patologista experiente em afecções pleuro-pulmonares. Os seguintes parâmetros foram analisados em cada caso: edema intersticial, edema alveolar, espessamento arteriolar, trombose vascular, fibrose intersticial, fibrina alveolar, exsudato alveolar, hemorragia alveolar, hemorragia intersticial, infiltrado inflamatório intersticial, reatividade de pneumócitos, macrófagos alveolares e necrose. De acordo com a intensidade dessas alterações, o patologista atribuiu um valor para cada parâmetro: 0, ausência; 1, leve; 2, moderado; 3, intenso. Foi definido, dessa forma, o escore de lesão pulmonar (ELP), determinado pela soma do valor de cada parâmetro. O ELP de cada caso podia variar de 0 a 39, de modo que quanto maior era o escore, mais intensa era a lesão tecidual naquela amostra.

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

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

As lâminas foram desparafinizadas em três banhos de xilol (5 minutos cada banho) e reidratadas em gradiente de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%). Era aplicada a Proteinase K nas lâminas, as quais eram mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, era feita a lavagem das lâminas com dois banhos (3 minutos cada) em PBS (*phosphate-buffered saline*). Elas eram, então, incubadas com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,3% e metanol por 30 minutos em temperatura ambiente, e, logo após, lavadas duas vezes em PBS. Na sequência, eram aplicados 50 µl da mistura TUNEL (5 µl da solução da enzima TdT – tubo azul – e 45 µl da solução do nucleotídeo marcado – tubo roxo) em cada amostra. Estas eram colocadas em câmara úmida a 37 °C por 60 minutos. Por fim, as lâminas eram lavadas três vezes em PBS e preparadas com glicerina e lamínula de vidro para análise em microscópio de fluorescência.

As lâminas foram examinadas em microscópio (Axioskop 2 Plus; Carl Zeiss, Jena, Alemanha) de fluorescência, através de um filtro de 590 nm, com um aumento de x400. O sistema incluía uma câmera acoplada ao microscópio para captura das imagens, ligada a um computador. Através do *software* de processamento de imagens digitais AxioVision versão 4.7 (Carl Zeiss), a imagem era mostrada no monitor em um campo de 0,02 mm², e as células apoptóticas eram visualizadas na cor verde brilhante (Figura 5). As

células apoptóticas foram contadas em cinco campos escolhidos aleatoriamente (área total de $0,1 \text{ mm}^2$; aumento de x400).

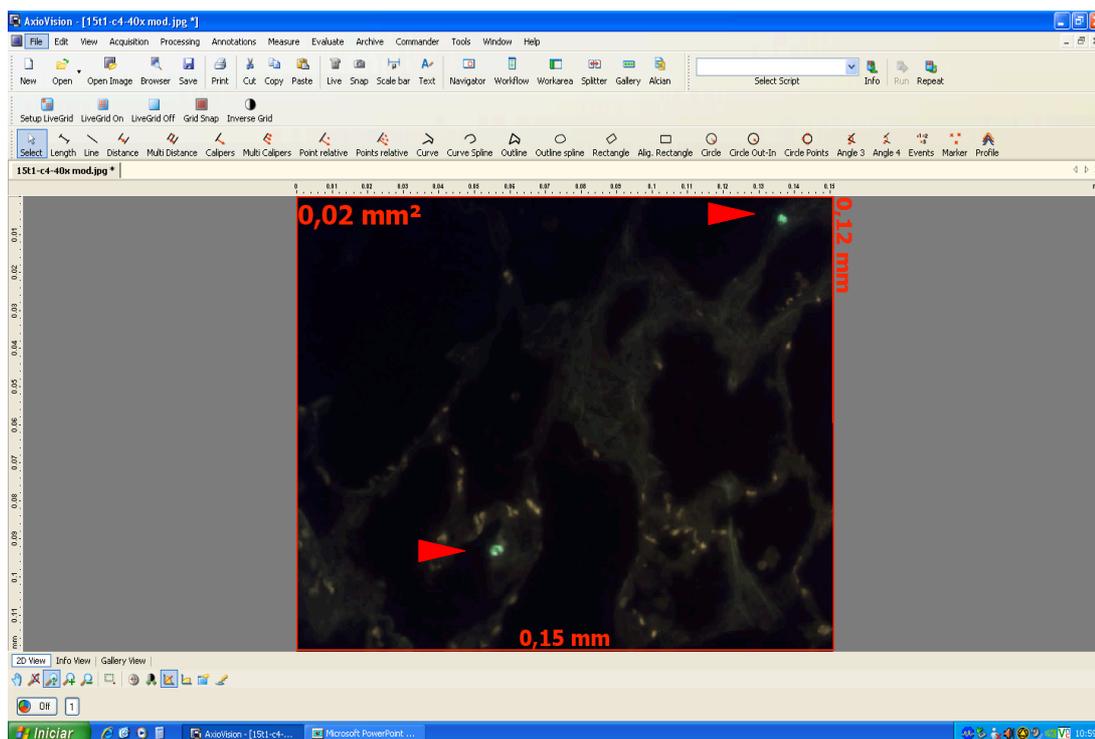


Figura 5. Identificação das células apoptóticas (400X) no *software* AxioVision (setas).

4.4 Análise estatística

As análises descritivas foram realizadas apresentando médias e desvios padrão para variáveis de distribuição normal ou medianas e intervalos interquartis para variáveis que não tinham distribuição normal.

Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados com o teste de Shapiro-Wilk e com o teste de Levene respectivamente.

A comparação dos grupos quanto às características dos doadores (idade, IMC, tabagismo, pneumonia etc.) e dos pulmões doados (gasometria, análise histopatológica) foi efetuada com o teste qui-quadrado (ou exato de Fisher) para as variáveis categóricas e teste t de Student para as variáveis contínuas. Já a análise estatística das variáveis de desfecho que foram coletadas uma única vez ao longo do estudo foi realizada utilizando-se o teste t de Student para variáveis de distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para variáveis que não tiveram distribuição normal. Para as variáveis de desfecho coletadas em dois tempos (escore de lesão pulmonar e contagem de células apoptóticas) foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas.

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

As análises estatísticas descritivas e inferenciais foram executadas com o *software* SPSS versão 17.0.

5 RESULTADOS

As captações dos 16 blocos pulmonares ocorreram no período de abril de 2009 a abril de 2010. Os doadores tinham idade média de 45,6 anos (\pm 20,0), sendo 9 homens e 7 mulheres. A maioria desses pulmões foi rejeitada por uma gasometria arterial insatisfatória (PaO_2 inferior a 300 mmHg com FiO_2 de 100% e PEEP de 5 cmH_2O), presente em 13 dos 16 doadores. Dois doadores, embora com gasometrias satisfatórias, foram rejeitados devido à presença de pneumonia, e um doador foi recusado pela ausência de um receptor compatível em lista. As principais causas de óbito foram o acidente vascular cerebral (AVC) hemorrágico (sete doadores) e a hemorragia subaracnóide (quatro doadores). A Tabela 2 mostra que os dois grupos estudados eram semelhantes quanto às características demográficas dos doadores. A análise histológica dos pulmões captados também indicou que os dois grupos de pulmões eram morfologicamente semelhantes (Tabela 3).

Tabela 2. Características clínicas e demográficas dos doadores

Doadores	Grupo LPD-G nacional	Grupo Perfadex®	Valor de p
	(n = 8)	(n = 8)	
Sexo (M:F)	6 : 2	3 : 5	0,315
Idade (anos)	40,9 (± 20,8)	50,2 (±19,4)	0,367
IMC (kg/cm ²) ¹	25,1 (± 4,3)	26,7 (± 3,7)	0,447
Tabagismo	1	3	1,000
Pneumonia	4	4	1,000
Leucometria (/mm ³)	14 685 (± 3 913,7)	16 710 (± 5 244,6)	0,396
VM (dias) ²	7,8 (± 5,8)	5,9 (± 3,4)	0,439
PaO ₂ (mmHg) ³	181,36 (± 85,01)	206,04 (± 119,25)	0,641

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

¹ Índice de massa corpórea (peso/altura²).

² Tempo que o doador ficou intubado em ventilação mecânica.

³ Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (gasometria arterial colhida com FiO₂ 100% e PEEP 5 cmH₂O).

Tabela 3. Avaliação histológica dos pulmões doados

	Grupo LPD-G nacional	Grupo Perfadex®	Valor de p
	(n = 8)	(n = 8)	
ELP ¹	3,9 (± 2,4)	3,8 (± 2,8)	0,925
Células apoptóticas (/mm ²) ²	200,0 (75,0 - 562,5)	175,0 (0 - 62,5)	0,561

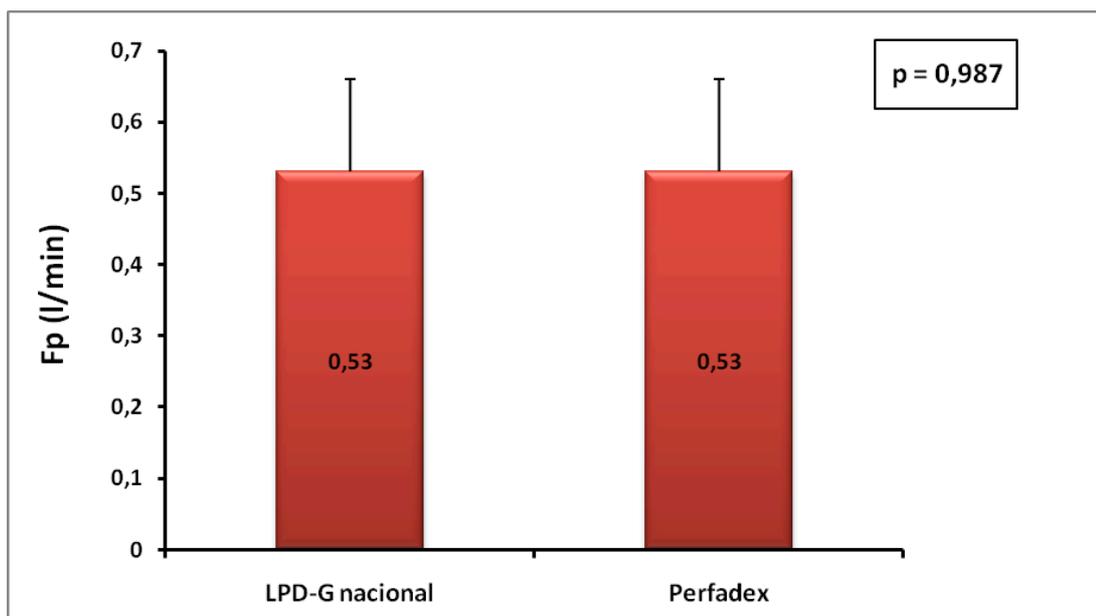
¹ Escore de lesão pulmonar (média ± desvio padrão).

² A contagem de células apoptóticas no tecido pulmonar colhido durante a captação não tinha distribuição normal, por isso seu resultado está expresso como mediana (intervalo interquartil).

5.1 Fluxo de perfusão

O fluxo de perfusão (Fp) médio da solução LPD-G nacional administrada na artéria pulmonar durante a captação foi de 0,53 l/min ($\pm 0,16$ l/min). Não houve diferença (Gráfico 1) estatisticamente significativa com o grupo controle (Perfadex[®]), cujo Fp médio foi de 0,53 l/min ($\pm 0,15$ l/min).

Gráfico 1. Medida do fluxo de perfusão (Fp) das soluções de preservação durante a captação dos pulmões.



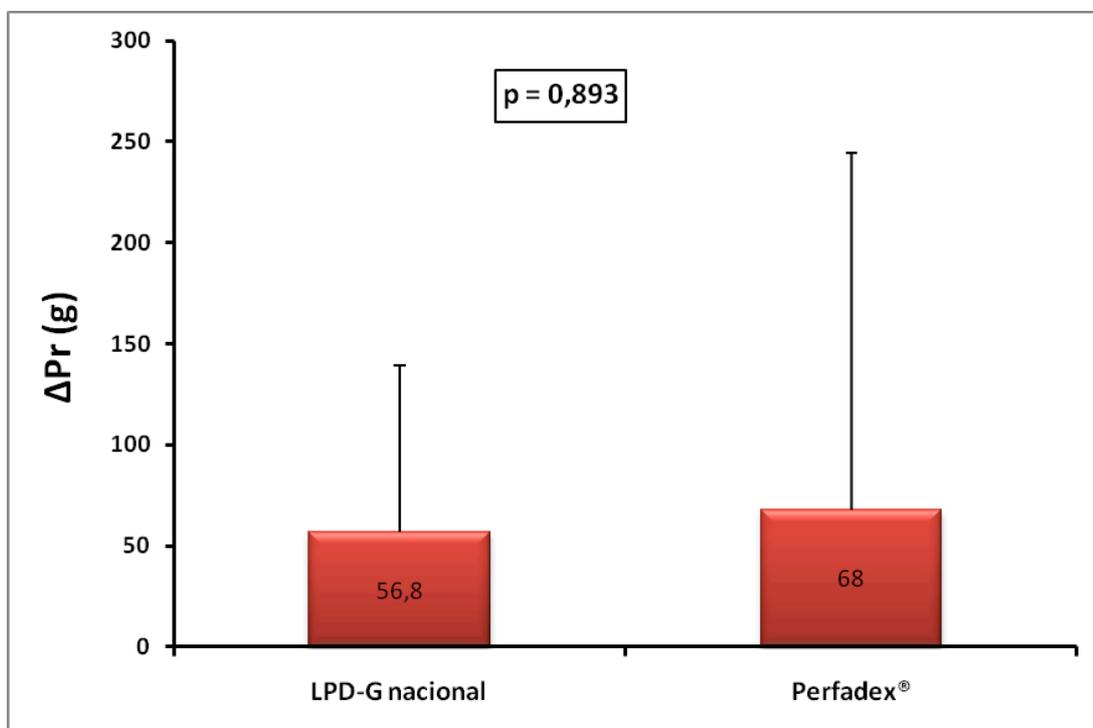
NOTA: As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

5.2 Variação de peso

Após as 10 horas de isquemia fria, houve uma perda de peso média de 43,0 g (\pm 26,9 g) e 28,0 g (\pm 72,3 g) nos grupos LPD-G nacional e Perfadex[®], respectivamente. Após 60 minutos de reperfusão no modelo de avaliação pulmonar *ex vivo*, houve um ganho de peso médio de 56,8 g (\pm 98,9 g) e 68,0 g (\pm 210,8 g) nos grupos LPD-G nacional e Perfadex[®], respectivamente.

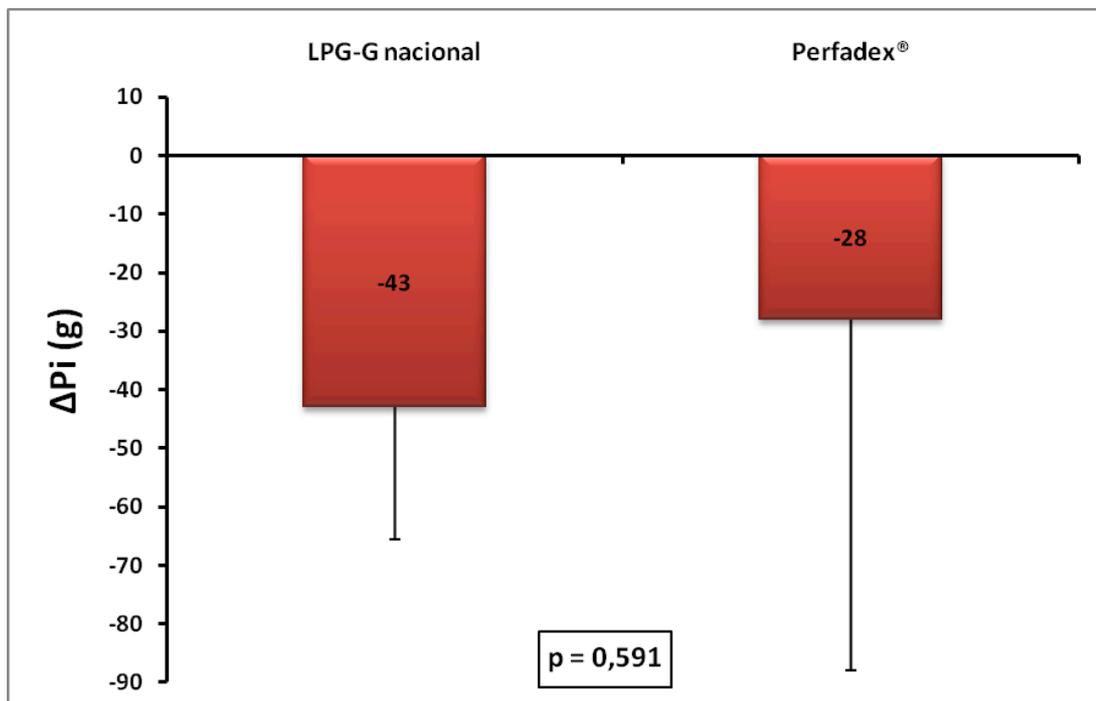
Não houve diferença entre os dois grupos (Gráficos 2 e 3) quanto à variação de peso pós-isquemia (Δ Pi) e pós-reperfusão (Δ Pr).

Gráfico 2. Variação de peso (Δ Pi) dos blocos pulmonares após o período de isquemia.



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

Gráfico 3. Variação de peso (ΔPi) dos blocos pulmonares após reperfusão.

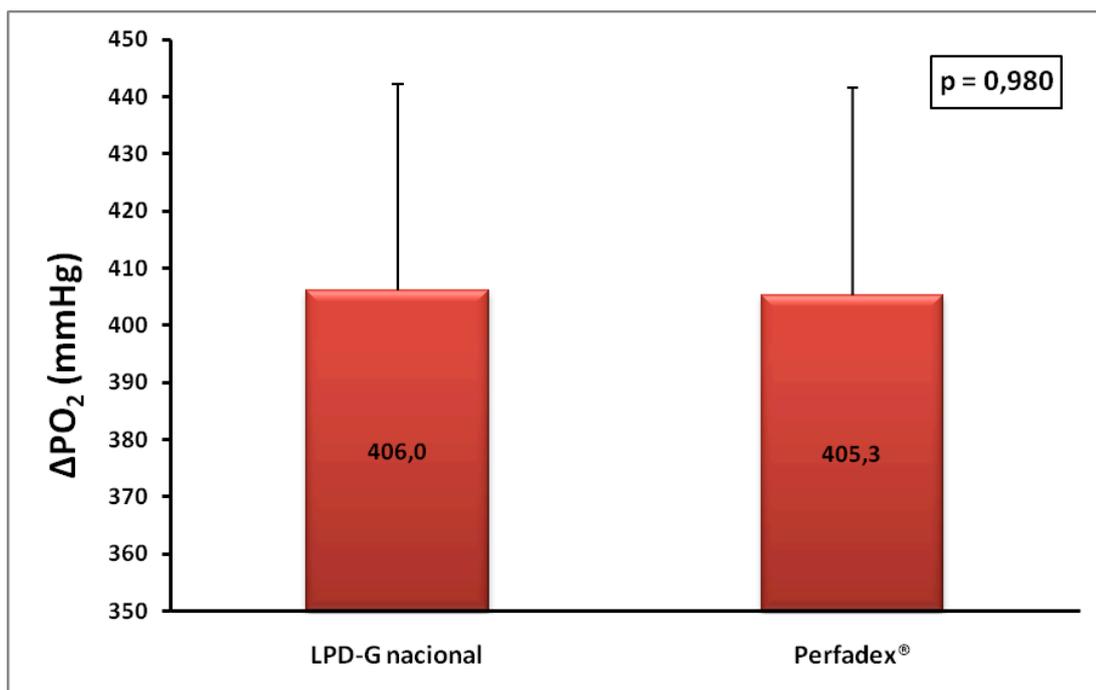


NOTA: As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

5.3 Avaliação funcional

Após a reperfusão, a capacidade de oxigenação (ΔPO_2) média dos pulmões do grupo LPD-G nacional foi de 406,0 mmHg ($\pm 43,5$ mmHg). No grupo Perfadex[®], a ΔPO_2 média foi de 405,3 mmHg ($\pm 52,4$ mmHg). Não houve diferença significativa (Gráfico 4) entre os grupos quanto à capacidade de oxigenação dos pulmões após a reperfusão.

Gráfico 4. Capacidade de oxigenação (ΔPO_2) dos pulmões após reperfusão.



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

5.4 Avaliação hemodinâmica

Das variáveis de desfecho estudadas, a resistência vascular pulmonar (RVP) foi a única que não teve uma distribuição normal; por isso, seus valores foram expressos como mediana (intervalo interquartil). A mediana da RVP medida após 60 minutos de reperfusão nos pulmões do grupo LPD-G nacional foi de 378,3 dina.s.cm⁻⁵ (351,8 – 628,2 dina.s.cm⁻⁵), enquanto no grupo Perfadex®, esse valor foi de 697,6 dina.s.cm⁻⁵ (493,0 – 1040,0 dina.s.cm⁻⁵). Essa diferença foi estatisticamente significativa (Gráfico 5).

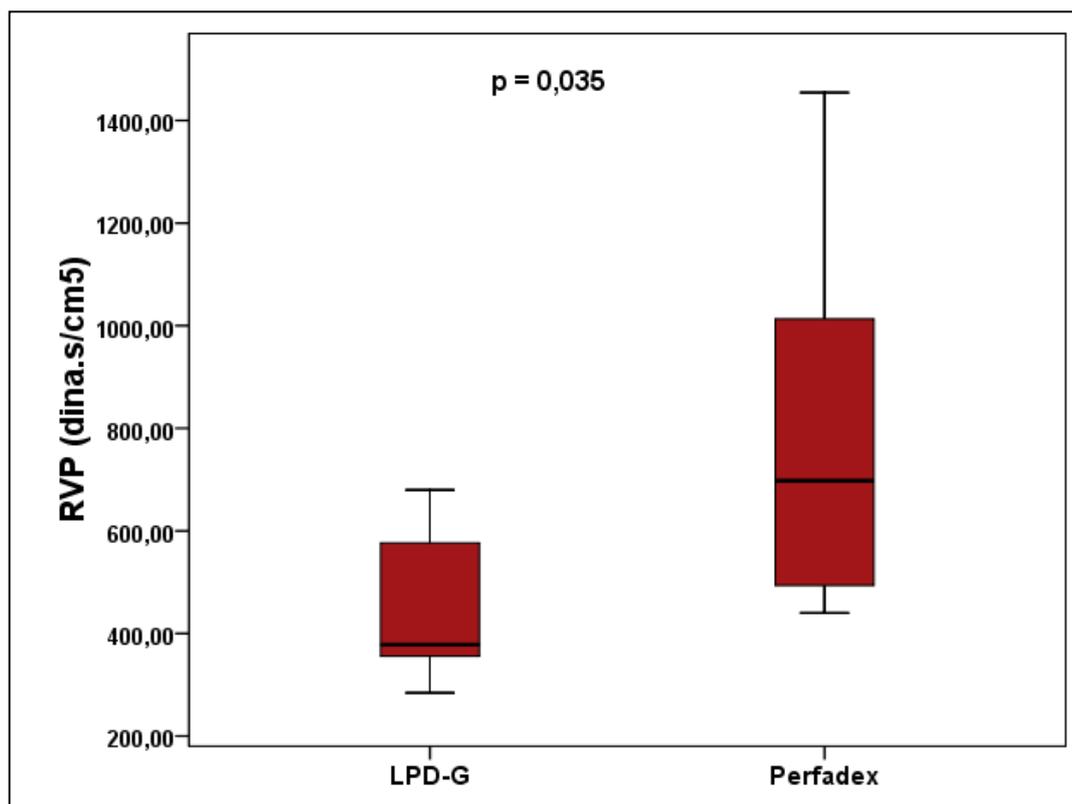
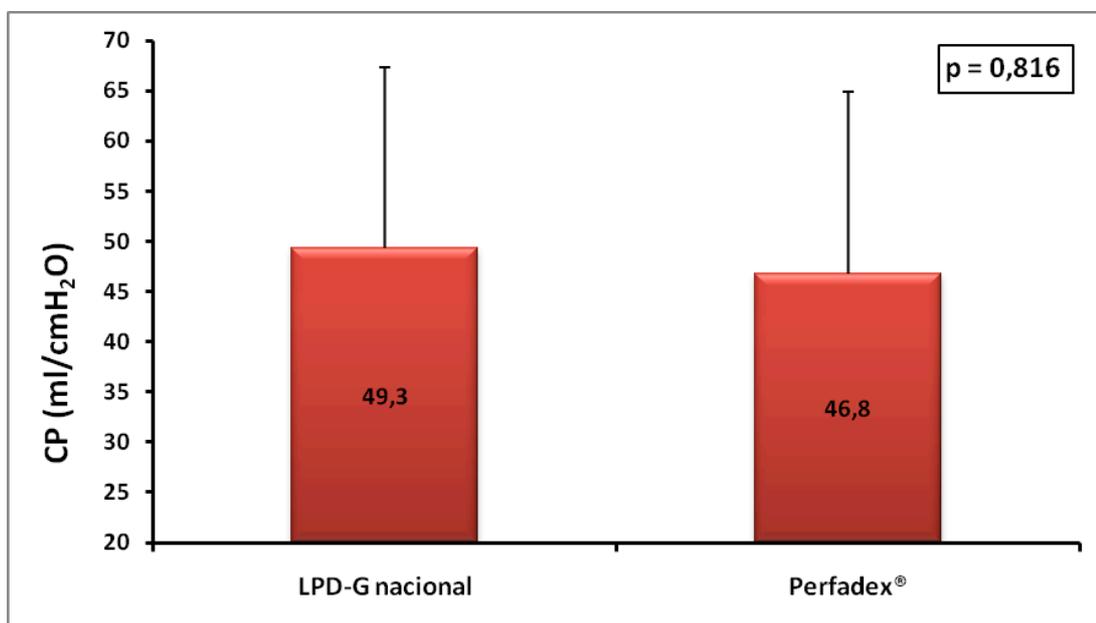


Gráfico 5. Resistência vascular dos pulmões (RVP) após reperfusão.

5.5 Avaliação ventilatória

A complacência pulmonar média ao final da reperfusão nos casos do grupo LPD-G nacional foi de 49,3 ml/cmH₂O (\pm 21,7 ml/cmH₂O). Os pulmões preservados com Perfadex[®] tiveram uma complacência média de 46,8 cmH₂O (\pm 21,0 cmH₂O) após 1 hora no modelo de avaliação pulmonar *ex vivo*. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto à complacência pulmonar (Gráfico 6).

Gráfico 6. Complacência pulmonar (CP) após reperfusão.

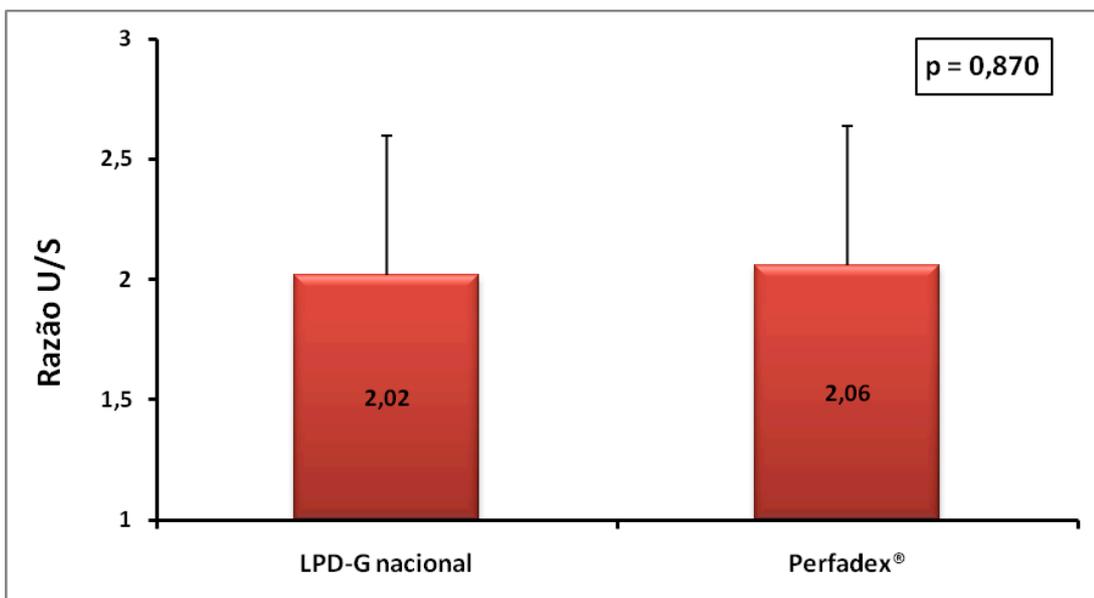


NOTA: As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

5.6 Razão peso úmido-peso seco

A razão entre o peso úmido e o peso seco foi em média 2,02 ($\pm 0,70$) e 2,06 ($\pm 0,28$) nos grupos LPD-G nacional e Perfadex[®], respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa como visualizado no Gráfico 7.

Gráfico 7. Razão peso úmido-peso seco do pulmão esquerdo ao final da reperfusão.



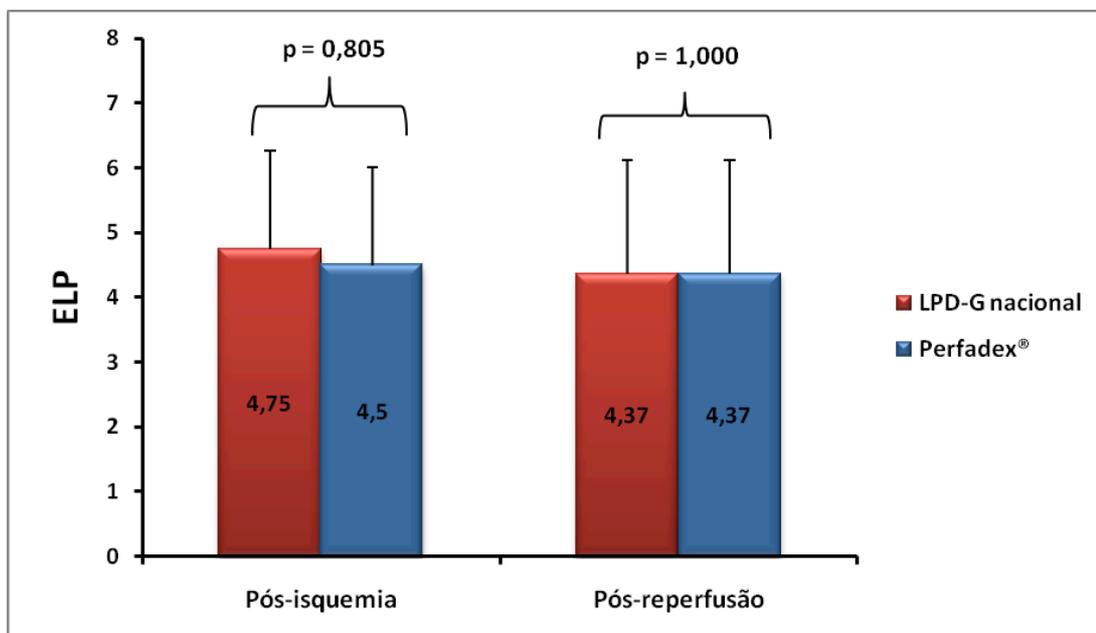
NOTA: As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

5.7 Avaliação histológica

O Escore de Lesão Pulmonar (ELP) médio, determinado na biópsia realizada após 10 horas de isquemia fria, foi de 4,75 ($\pm 1,83$) no grupo LPD-G nacional e 4,50 ($\pm 2,14$) no grupo Perfadex[®]. Na biópsia realizada após 60

minutos de reperfusão no modelo de avaliação pulmonar *ex vivo*, o ELP médio foi de 4,37 (\pm 2,88) e 4,37 (\pm 1,51), respectivamente (Gráfico 8). Não houve diferença estatisticamente significativa do ELP entre os grupos ao longo do tempo ($p = 0,855$).

Gráfico 8. Comparação do Escore de Lesão Pulmonar (ELP) entre os grupos de estudo, obtidos em dois tempos: após 10 horas de isquemia fria e após 1 hora de reperfusão normotérmica.

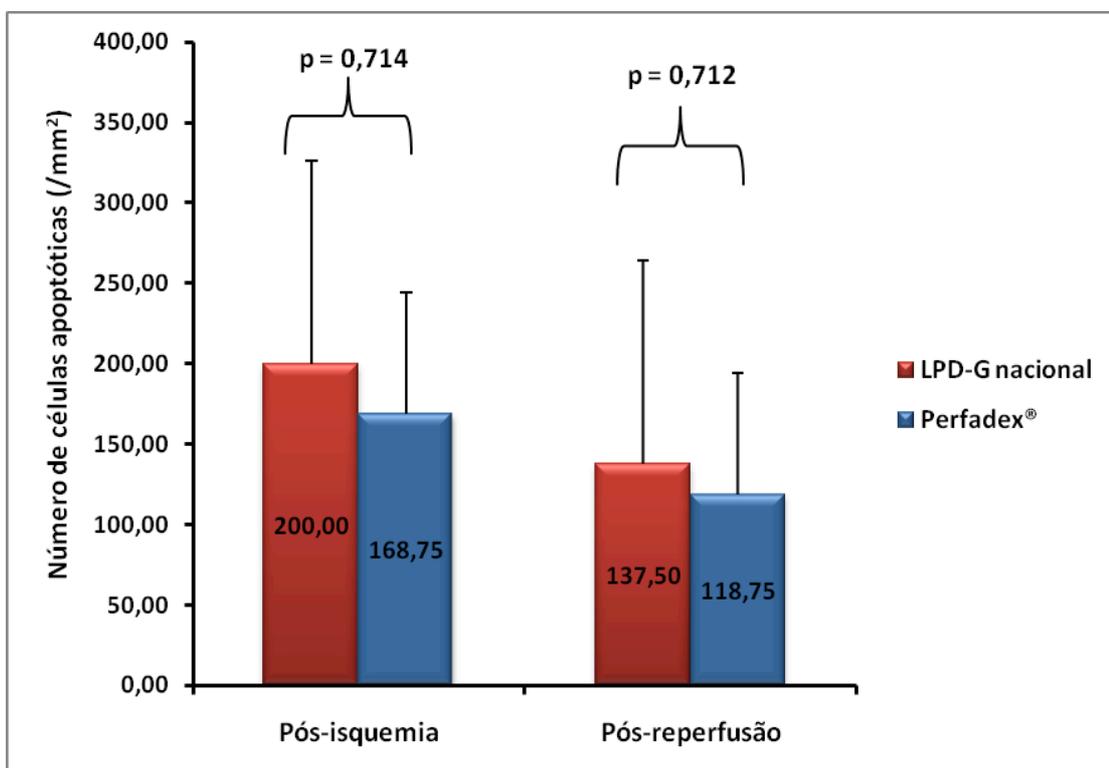


NOTA: As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

A identificação de células apoptóticas pela reação TUNEL no tecido pulmonar colhido após o período de isquemia mostrou uma média de 200,00 (\pm 160,36) células apoptóticas/mm² no grupo LPD-G nacional e 168,75 (\pm 173,08) células apoptóticas/mm² no grupo Perfadex®. No tecido colhido após a reperfusão, observou-se uma média de 137,50 (\pm 99,10) e 118,75 (\pm

99,78) células apoptóticas/mm², respectivamente (Gráfico 9). Não houve diferença estatisticamente significativa da contagem de células apoptóticas entre os grupos ao longo do tempo ($p = 0,903$).

Gráfico 9. Comparação da contagem de células apoptóticas entre os dois grupos de estudo em dois tempos: após 10 horas de isquemia fria e após 1 hora de reperfusão normotérmica.



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

6 DISCUSSÃO

Desde a década de 1980, quando os transplantes pulmonares tornaram-se uma realidade no tratamento de pacientes com graves pneumopatias, o número de procedimentos desse tipo aumentou em todo o mundo. Atualmente, existem 153 centros realizando transplantes de pulmões, sendo quatro deles no Brasil. A sobrevida em 5 anos após o transplante é de aproximadamente 52%⁸. O sucesso do transplante pulmonar deve-se, em parte, ao aperfeiçoamento das técnicas de preservação. Estas têm a finalidade de minimizar os efeitos deletérios da isquemia e diminuir a incidência de falência do enxerto após o implante.

Com o passar do tempo, ficou clinicamente comprovado que a estratégia mais eficaz era a perfusão hipotérmica dos pulmões com uma solução de preservação. Estas soluções têm o papel de resfriar uniformemente todo o pulmão, sem causar toxicidade para as células endoteliais e alveolares. Inúmeros estudos experimentais realizados nas duas últimas décadas mostraram a superioridade do Perfadex[®], uma solução extracelular contendo dextran e glicose, quando comparada a soluções intracelulares como Euro-Collins. Por essa razão, a maioria dos centros usa o Perfadex[®] como solução de preservação pulmonar, incluindo o InCor – HCFMUSP.

Como se trata de uma solução importada, os hospitais brasileiros costumam enfrentar algumas dificuldades com o Perfadex[®], não só pelo seu alto custo, mas também pelos entraves burocráticos nos portos e aeroportos

brasileiros. Isso provoca paralisações temporárias nos centros que já fazem transplantes, bem como atraso na abertura de novos centros. Uma solução de preservação pulmonar produzida no Brasil poderia atenuar esses problemas.

6.1 Casuística

A maior parte dos estudos experimentais envolvendo a comparação de soluções de preservação pulmonar foi feita com modelos animais (ratos e porcos, principalmente), incluindo o estudo inicial de Soares et al.⁶⁴, que comparou a solução LPD-G Nacional com o Perfadex[®]. Tal estudo mostrou a viabilidade do LPD-G Nacional para um tempo de isquemia fria de 6 horas. Optamos por utilizar pulmões humanos nesse trabalho, uma vez que o objetivo final é o uso clínico da solução LPD-G Nacional. Assim, o estudo feito em pulmões humanos doados, porém rejeitados para transplante, submetidos a 10 horas de isquemia fria, aproxima os achados experimentais da realidade clínica, tornando os resultados mais significativos. O uso de pulmões “danificados”, isto é, pulmões de doadores em morte cerebral, não comprometeu o estudo, já que se tratava de uma análise comparativa, e os pulmões de ambos os grupos eram semelhantes, como demonstrado na Tabela 2. Parâmetros clínicos e laboratoriais como presença de pneumonia, tempo de ventilação mecânica, leucometria e gasometria arterial (PaO₂), assim como a análise histológica, mostraram não haver diferença estatisticamente significativa entre os pulmões dos dois grupos.

O uso de pulmões humanos nesse estudo só foi possível devido ao desenvolvimento ocorrido nos últimos 10 anos da técnica da perfusão pulmonar *ex vivo*. O surgimento da Steen Solution[®], uma solução rica em albumina e dextran, possibilitou uma perfusão *ex vivo* estável por várias horas, sem a formação de edema.

Em 2006, Weyerup et al.⁷³ publicaram estudo experimental, no qual pulmões de doadores rejeitados para transplante foram submetidos a PPEV. Os doadores passaram em média 2 dias em ventilação mecânica e a PaO₂ média era de 186,9 mmHg. Após uma média de 7 horas de isquemia fria, os pulmões eram colocados no sistema de PPEV. Ao atingir a estabilidade, a PaO₂ média era de 384,3 mmHg e a mediana da RVP era de 400 dina.s.cm⁻⁵. No mesmo ano, Egan et al.⁷² publicaram estudo com a mesma metodologia. A PaO₂ média nos doadores era de 304,6 mmHg e o tempo média de isquemia fria foi de 8,7 horas. No sistema de PPEV, a PaO₂ média era de 383,8 mmHg. Em nosso estudo, apesar de trabalharmos com piores doadores (tempo médio de ventilação mecânica de 6,8 dias e PaO₂ médio de 193,7 mmHg) e com um tempo de isquemia fria maior (10 horas), conseguimos obter um sistema de PPEV estável por mais de 60 minutos. A PaO₂ média na PPEV era de 489 mmHg e a mediana da RVP era de 493,7 dina.s.cm⁻⁵, resultados semelhantes aos obtidos pelos pesquisadores citados anteriormente e que usaram a mesma metodologia. Isso mostra que o sistema de PPEV foi corretamente executado em nosso estudo.

6.2 Fluxo de perfusão

O fluxo de perfusão da solução de preservação administrada durante a captação dos órgãos é uma variável que depende da complacência e resistência do leito vascular pulmonar, bem como da composição química da solução de preservação. Wittwer et al.⁵³ compararam as soluções Celsior[®] e Perfadex[®] em um modelo experimental com pulmões de ratos. Observaram que o tempo de perfusão anterógrada foi de 66 segundos e 102 segundos para Celsior[®] e Perfadex[®] respectivamente. Os autores atribuíram essa diferença a menor viscosidade do Celsior[®], já que este não contém dextran.

Em nosso estudo, como os pulmões de ambos os grupos eram semelhantes (Tabelas 2 e 3), alguma discrepância existente na variável fluxo de perfusão poderia ser atribuída a diferenças na composição das duas soluções analisadas. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os fluxos de perfusão dos dois grupos.

6.3 Edema pulmonar

A retenção de água é um fato inevitável no processo de isquemia-reperfusão, consequência do aumento da permeabilidade vascular e ruptura da barreira alvéolo-capilar. Como o grau de edema é inversamente proporcional à qualidade da preservação, a mensuração do conteúdo de água nos pulmões é um índice utilizado na maioria dos estudos de preservação pulmonar. A variação do peso é uma medida simples, porém

sofre influência de outros fatores como hemorragia alveolar. Além disso, é menos sensível e pode não detectar graus mais leves de edema. Por isso, alguns autores têm optado por medidas mais precisas da água nos vários compartimentos pulmonares, usando corantes, radiomarcadores ou sondas especiais para monitorização *on-line* do conteúdo de água extravascular. Em nosso estudo, a variação do peso foi semelhante nos dois grupos. Após 10 horas de isquemia fria, observamos uma pequena redução do peso, provavelmente devido ao extravasamento de sangue durante o armazenamento. Depois da reperfusão, houve ganho de peso (edema de reperfusão).

A razão peso úmido-peso seco medida ao final da reperfusão também reflete a formação de edema durante o período de isquemia-reperfusão: quanto maior o valor da relação, maior o edema acumulado. A razão U/S foi semelhante nos dois grupos, resultado compatível com a variável variação de peso. Essas variáveis mostram a formação de edema ocorreu igualmente nos pulmões preservados com Perfadex[®] e LPD-G Nacional.

6.4 Avaliação funcional

Os parâmetros funcionais são fáceis de coletar e continuam a ser a base de qualquer estudo de preservação pulmonar. Acreditamos que a mensuração da capacidade de oxigenação é o parâmetro mais importante da avaliação funcional, uma vez que, fisiologicamente, o papel primordial dos pulmões consiste em sua capacidade de troca gasosa. Alguns estudos

têm demonstrado que a medida da PaO_2 é o parâmetro mais confiável para determinar a qualidade da preservação pulmonar, quando comparado a parâmetros morfológicos, radiológicos, bioquímicos e hemodinâmicos. A medida da pressão parcial arterial de oxigênio (PaO_2) ou o gradiente alvéolo-arterial de oxigênio [$P(A-a)O_2$] são usados em todos os estudos de preservação pulmonar. Wang et al.⁶⁶, estudando os efeitos do tempo de isquemia e da temperatura na preservação pulmonar em um modelo *ex vivo* de pulmões de coelhos, observaram que a medida da troca gasosa tinha uma correlação significativa com a qualidade da preservação: o prolongamento do tempo de isquemia resultou em deterioração da troca gasosa. Em contrapartida, os autores viram que a variável pressão de via aérea era pouco sensível para avaliar a qualidade da preservação: ela só aumentava quando a função pulmonar estava seriamente comprometida.

Nossos resultados mostraram que a capacidade de oxigenação era semelhante nos dois grupos, o que demonstra que a qualidade da preservação pulmonar obtida com LPD-G Nacional é equivalente a do Perfadex[®]. Esse resultado é semelhante ao encontrado no estudo de Soares et al.⁶⁴, que comparou as mesmas soluções em um modelo de avaliação *ex vivo* de pulmões de ratos.

A complacência pulmonar é um parâmetro importante e deve ser usado desde que os ajustes do ventilador sejam mantidos constantes ao longo do procedimento. Na lesão de isquemia-reperfusão, observa-se uma redução da complacência pulmonar, devido à formação de edema alveolar e intersticial. Em nosso trabalho, a análise dessa variável foi coerente com as

variáveis descritas anteriormente: não houve diferença da complacência entre os dois grupos. No estudo de Soares et al.⁶⁴, o Perfadex[®] foi superior ao LPD-G Nacional quando se avaliaram os parâmetros de mecânica ventilatória.

A hemodinâmica pulmonar (pressão de artéria pulmonar e resistência vascular pulmonar) é parte importante da avaliação funcional, porém está sujeita a outras variáveis como denervação pulmonar e presença de anastomoses. Logo, alterações hemodinâmicas podem não refletir necessariamente o grau de injúria de isquemia. Em nosso modelo de reperfusão *ex vivo*, a resistência vascular pulmonar foi a única variável que mostrou diferença entre os grupos estudados, sendo maior nos pulmões preservados com Perfadex[®]. Como essa diferença foi discreta ($p = 0,035$), é possível que tenha ocorrido somente pelo acaso, não refletindo necessariamente uma discrepância entre as soluções estudadas, uma vez que todos os outros parâmetros analisados foram semelhantes em ambos os grupos.

6.5 Avaliação histológica

A isquemia pulmonar está associada a uma série de alterações histológicas, incluindo edema alveolar, ruptura e espessamento da membrana alvéolo-capilar e hemorragia focal. Essas alterações podem ser visualizadas tanto na microscopia de luz convencional quanto na microscopia eletrônica. No entanto, os parâmetros histológicos como medida

da qualidade da preservação pulmonar têm algumas limitações, uma vez que as mudanças estruturais sofridas pelo pulmão durante o período de isquemia tendem a ser heterogêneas e não necessariamente se correlacionam com a duração da isquemia ou com o dano funcional.

Optamos por fazer uma análise semi-quantitativa em nosso estudo: um patologista experiente via as lâminas e classificava os achados (edema alveolar, infiltrado inflamatório intersticial, hemorragia etc.) em ausente, leve, moderado ou intenso. O escore resultante dessa análise era usado para comparar os grupos estudados. Os dois grupos tinham o mesmo grau de lesão tecidual, tanto após o período de isquemia fria quanto após a reperfusão. Vários estudos experimentais publicados nas duas últimas décadas usaram esse tipo de análise para comparar soluções de preservação.

Análises de viabilidade celular são comuns em pesquisas sobre preservação pulmonar. A quantificação de células mortas tem sido feita com o uso do corante *trypan-blue*. Estudos da década de 1960 já mostravam que 80% das células estavam vivas após 48 horas de isquemia⁸². No entanto, havia pouca correlação entre a viabilidade celular e o grau de comprometimento funcional. Mais recentemente, vários pesquisadores passaram a estudar o mecanismo de morte celular e sua relação com a lesão de isquemia reperfusão. A detecção de células apoptóticas é feita com técnica de imunohistoquímica *TUNEL – in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling*, baseada na capacidade da enzima TdT de catalisar a adição de desoxirribonucleotídeo trifosfato ao terminal 3'-OH da fita de DNA.

Fischer et al.⁸³ mostraram um aumento do número de células apoptóticas em pulmões humanos transplantados: após 2 horas de reperfusão do enxerto, havia cerca de 35% de células apoptóticas. Esse mesmo grupo, usando um modelo de transplante pulmonar em ratos, demonstrou que havia uma associação entre o tempo de isquemia, a quantidade e o tipo de morte celular e a função dos enxertos após o implante⁸⁴. Após 6 e 12 horas de isquemia fria, havia menos de 3% de células mortas. O percentual de células mortas aumentou para 10% após 18 horas de isquemia fria e 27% após 24 horas de isquemia. Depois da reperfusão, houve predomínio de células apoptóticas nos grupos com períodos mais curtos de isquemia (cerca de 30% de apoptose e menos de 2% de necrose), enquanto nos grupos com 18 e 24 horas de isquemia, houve predomínio de células necróticas (21% e 29% respectivamente de necrose, com menos de 1% de apoptose). A função pulmonar (PaO_2) diminuiu significativamente com o aumento do tempo de isquemia. Houve uma correlação negativa estatisticamente significativa entre o percentual de células necróticas e a função do enxerto após o implante.

Nos pulmões avaliados em nosso trabalho, a quantidade de células apoptóticas nas amostras examinadas era pequena, possivelmente devido ao período de isquemia inferior a 12 horas e a reperfusão de apenas 1 hora. Comparando os dois grupos, a quantidade de células apoptóticas foi equivalente, tanto após o período de isquemia fria, quanto depois da reperfusão.

6.6 Considerações finais

A despeito de todas as vantagens citadas anteriormente, o modelo de perfusão pulmonar *ex vivo* não simula completamente a reperfusão que ocorre *in vivo*. O uso de uma solução acelular minimiza os efeitos da lesão de reperfusão. A perfusão com sangue permitiria simular a interação das células circulantes com o endotélio pulmonar e todas as suas consequências: ativação e migração de leucócitos, ativação plaquetária, trombose, produção de citocinas e radicais livres de oxigênio. Isso explica porque os valores médios do ELP em ambos os grupos são relativamente baixos. Optamos por não usar sangue humano, pois sua aplicação nesse tipo de pesquisa acarretaria problemas éticos, além de elevar muito o seu custo.

Outra limitação do nosso estudo é o curto período de reperfusão (60 minutos). Atualmente, estamos trabalhando em estratégias para prolongar o tempo de reperfusão no modelo de PPEV. Uma delas é a anastomose de uma cânula no átrio esquerdo para criar um circuito totalmente fechado, gerando uma pressão levemente positiva no átrio esquerdo (5 mmHg). Essa estratégia protege a microcirculação pulmonar, evitando o colapso das veias durante a fase inspiratória na qual o fluxo diminui.

Contudo, essas limitações não enfraquecem nossas conclusões, pois os resultados são consistentes e têm grande implicação clínica: a qualidade da preservação obtida com a solução LPD-G Nacional não é inferior a obtida

com o Perfadex[®]. Sendo assim, o uso dessa solução em pulmões humanos é possível e trará benefícios como o menor custo, o que facilitará a manutenção de Programas de Transplante Pulmonar já existentes e a abertura de novos centros.

O sistema de PPEV mostrou-se uma boa ferramenta para a realização de estudos de preservação pulmonar para transplante. Futuras investigações devem incluir a avaliação de novas estratégias de preservação, como a ventilação com perfluorocarbonos, a administração de surfactante e a perfusão *ex vivo* com antibióticos, trombolíticos e outras drogas. A inclusão de aditivos à solução de preservação, como os antioxidantes, pode dar origem a soluções de preservação ainda melhores do que o Perfadex[®].

7 CONCLUSÃO

A qualidade da preservação pulmonar obtida com a solução LPD-G Nacional é semelhante a obtida com a solução Perfadex[®]. Em outras palavras, a lesão de isquemia-reperfusão foi equivalente nos pulmões preservados com LPD-G Nacional e Perfadex.

Isso mostra que a solução de preservação pulmonar fabricada no Brasil pode ser usada na prática clínica com sucesso, minimizando o alto custo associado ao transplante pulmonar e facilitando a abertura e organização de novos centros.

8 REFERÊNCIAS

1. Linden PK. History of solid organ transplantation and organ donation. *Crit Care Clin.* 2009; 25: 165-84.
2. Rutherford RM, Lordan JL, Fisher AJ, Corris PA. Historical overview of lung and heart-lung transplantation. In: Lynch JP, Ross DJ, editores. *Lung and Heart-lung Transplantation.* New York: Taylor & Francis; 2006. p. 1-20.
3. Orens JB, Garrity ER. General overview of lung transplantation and review of organ allocation. *Proc Am Thorac Soc.* 2009; 6: 13-9.
4. Cooper JD, Ginsberg RJ, Goldberg M, Patterson GA, Pearson FG, Todd TRJ, et al. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 1986; 314: 1140-5.
5. Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA, Todd TRJ, Ginsber RJ, Goldberg M et al. Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987; 93: 173-81.
6. 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.* 1990; 49: 785-91.
7. Botter M, Saad Junior R. Transplante pulmonar: o estado da arte. In: Saad Junior R, Carvalho WR, Ximenes Netto M, Forte V, editores. *Cirurgia Torácica Geral.* São Paulo: Atheneu; 2006. p. 499-529.
8. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-sixth official adult lung and heart-lung transplantation report – 2009. *J Heart Lung Transplant.* 2009; 28: 1031-49.

9. Registro Brasileiro de Transplantes – Ano XVI, nº 4, Jan/Dez 2010 [Associação Brasileira de Transplante de Órgãos]. São Paulo, 2011.
10. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167: 490-511.
11. Mulligan MS. Primary graft dysfunction following lung transplantation: pathogenesis and impact on early and late outcomes. In: Lynch JP, Ross DJ, editores. *Lung and Heart-lung Transplantation*. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 437-64.
12. Carter YM, Gelman AE, Kreisel D. Pathogenesis, management and consequences of primary graft dysfunction. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2008; 20: 165-72.
13. de Perrot M, Keshavjee S. Lung preservation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 16: 300-8.
14. Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med*. 2000; 136: 427-40.
15. de Perrot M, Keshavjee S. Lung preservation. *Chest Surg Clin N Am*. 2003; 13: 443-62.
16. D' Ovidio F, Keshavjee S. Lung preservation techniques. In: Lynch JP, Ross DJ, editores. *Lung and Heart-lung Transplantation*. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 325-47.
17. Jatene FB, Pêgo-Fernandes PM. Desafios do transplante pulmonar. *J Bras Pneumol*. 2009; 34(5): 249-50.
18. Egan TM. Lung preservation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 1992; 4(2): 83-9.

19. Kirk AJB, Colquhoun IW, Dark JH. Lung preservation: a review of current practice and future directions. *Ann Thorac Surg.* 1993; 56: 990-1000.
20. Hardesty RL, Griffith BP. Autoperfusion of the heart and lungs for preservation during distant procurement. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987; 93: 11-8.
21. Yacoub MH, Khaghani A, Banner N, Tajkarimi S, Fitzgerald M. Distant organ procurement for heart and lung transplantation. *Transplant Proc.* 1989; 21: 2548-50.
22. Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transplantation: initial perfusion and 30 hours ice storage. *Lancet.* 1969; 2: 1219-22.
23. Sack SA, Petritsch SH, Kaufman JJ. Canine kidney preservation using a new perfusate. *Lancet.* 1973; 1: 1024-8.
24. Hakim M, Higenbottam T, Bethune D, Cory-Pearce R, English TAH, Kneeshaw J, et al. Selection and procurement of combined heart and lung grafts for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988; 95: 474-9.
25. Baldwin JC, Frist WH, Starkey TD, Harjula A, Starnes VA, Stinson EB, et al. Distant graft procurement for combined heart and lung transplantation using pulmonary artery flush and simple topical hypothermia for graft preservation. *Ann Thorac Surg.* 1987; 43: 670-3.
26. Locke TJ, Hooper TL, Flecknell PA, McGregor CGA. Preservation of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988; 96: 789-95.
27. Haverich A, Scott WC, Jamieson SW. Twenty years of lung preservation: a review. *Heart Transplant.* 1985; 4: 234-40.

28. Veith FJ, Crane R, Torres M, Colon I, Hagstrom JWC, Pinsky K, et al. Effective preservation and transportation of lung transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1976; 72: 97-105.
29. Starkey TD, Sakakibara N, Hagberg RC, Tazelaar HD, Baldwin JC, Jamieson SW. Successful six-hour cardiopulmonary preservation with simple hypothermic crystalloid flush. *J Heart Transplant.* 1986; 5: 291-7.
30. Bresticker MA, LoCicero J III, Oba J, Greene R. Successful extended lung preservation with UW solution. *Transplantation.* 1992; 54: 780-4.
31. Kawahara K, Kobayashi S, Takahashi T, Nakamura A, Yamamoto S, Tagawa M, et al. Efficacy of UW solution for canine lung preservation. *Transplant Proc.* 1993; 25: 1599-600.
32. Yamasaki F, Yokomise H, Keshafjee SH, Miuoshi S, Cardoso PF, Slutsky AS, et al. Superiority of an extracellular solution over Euro-Collins solution for pulmonary preservation. *Transplantation.* 1990; 49: 690-4.
33. Unruh H, Hoppensack M, Oppenheimer L. Vascular properties of canine lungs perfused with Euro-Collins solution and prostacyclin. *Ann Thorac Surg.* 1990; 49; 292-8.
34. Hachida M, Hoon DSB, Morton DL. A comparison of solutions for lung preservation using pulmonary alveolar type II cell viability. *Ann Thorac Surg.* 1988; 45: 643-6.
35. Maccherini M, Keshafjee SH, Slutsky AS, Patterson GA, Edelson JD. The effect of low-potassium dextran versus Euro-Collins solution for preservation of isolated type II pneumocytes. *Transplantation.* 1991; 52: 621-6.

36. Fujimura S, Handa M, Kondo T, Ichinose T, Shiraishi Y, Nakada T. Successful 48-hour simple hypothermic preservation of canine lung transplants. *Transplant Proc.* 1987; 19: 1334-6.
37. Keshavjee SH, Yamazaki F, Cardoso PF, McRitchie DI, Patterson GA, Cooper JD. A method for safe twelve-hour pulmonary preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989; 98: 529-34.
38. Keshavjee SH, Yamazaki F, Yokomise H, Cardoso PF, Mullen JBM, Slutsky AS, et al. The role of dextran 40 and potassium in extended hypothermic lung preservation for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992; 103: 314-25.
39. Date H, Matsumura A, Manchester JK, Obo H, Lima O, Cooper JM, et al. Evaluation of lung metabolism during successful twenty-four-hour canine lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993; 105: 480-91.
40. Steen S, Kimblad PO, Sjöberg T, Lindberg L, Ingemansson R, Massa G. Safe lung preservation for twenty-four hours with Perfadex. *Ann Thorac Surg.* 1994; 57: 450-7.
41. Bins OAR, DeLima NF, Buchanan SA, Cope JT, King RC, Marek CA, et al. Both blood and crystalloid-based extracellular solutions are superior to intracellular solutions for lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996; 112: 1515-21.
42. Kelly RF, Murar J, Hong Z, Nelson DP, Hong F, Varghese A, et al. Low-potassium-dextran lung preservation solution reduces reactive oxygen species production. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75: 1705-10.
43. Strüber M, Hohlfeld JM, Fraund S, Kim P, Warnecke G, Haverich A. Low-potassium-dextran solution ameliorates reperfusion injury of the lung and protects surfactant function. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000; 120: 566-72.

44. Soccia PM, Gasche Y, Pache JC, Schneuwly O, Slosman DO, Morel DR, et al. Matrix metalloproteinases correlate with alveolar-capillary permeability alteration in lung ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 2000; 70: 998-1005.
45. Hausen B, Beuke M, Schroeder F, Poets CF, Hewitt C, DelRossi AJ, et al. *In vivo* measurement of lung preservation solution efficacy: comparison of LPD, UW, EC and low K⁺-EC following short and extended ischemia. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1997; 12: 771-9.
46. King RC, Bins OA, Kanithanon RC, Parrino PE, Reece TB, Maliszewskyj, et al. Acellular low-potassium dextran preserves pulmonary function after 48 hours of ischemia. *Ann Thorac Surg*. 1997; 12: 771-9.
47. Chien S, Zhang F, Niu W, Tseng MT, Gray L Jr. Comparison of University of Wisconsin, Euro-Collins, low-potassium dextran, and krebs-henseleit solutions for hypothermic lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000; 119: 921-30.
48. Reignier J, Mazmanian M, Chapelier A, Alberici G, Menasche P, Weiss M, et al. Evaluation of a new preservation solution: Celsior in the isolated rat lung – Paris-Sud University Lung Transplantation Group. *J Heart Lung Transplant*. 1995; 14: 601-4.
49. Xiong L, Legagneux J, Wassef M, Oubenaissa A, Detruit H, Mouas C, et al. Protective effects of Celsior in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1999; 18: 320-7.
50. Thabut G, Vinatier I, Brugiere O, Leseche G, Loirat P, Bisson A, et al. Influence of preservation solution on early graft failure in clinical lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164: 1204-8.

51. Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, Sakamaki Y, Starnes VA, Barr ML. A comparison of the new preservation solution to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury. *Transplantation*. 1999; 67: 152-5.
52. Wittwer T, Wahlers T, Fehrenbach A, Elki S, Haverich A. Improvement of pulmonary preservation with Celsior and Perfadex: impact of storage time on early post-ischemic lung function. *J Heart Lung Transplant*. 1999; 18: 1198-1201.
53. Wittwer T, Fehrenbach A, Meyer D, Brandes H, Albes J, Richter J, et al. Retrograde flush perfusion with low-potassium solutions for improvement of experimental pulmonary preservation. *J Heart Lung Transplant*. 2000; 19: 976-83.
54. Sommer SP, Warnecke G, Hohlfeld JM, Gohrbandt B, Niedermeyer J, Kofidis T, et al. Pulmonary preservation with LPD and Celsior solution in porcine lung transplantation after 24h of cold ischemia. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004; 26: 151-7.
55. Franke UFW, Wittwer T, Fehrenbach A, Sandhaus T, Pfeifer F, Mueller T, et al. Pig lung transplantation using extracellular type preservation solutions. *J Heart Lung Transplant*. 2002; 21:58.
56. Hopkinson DN, Bhabra MS, Hooper TL. Pulmonary graft preservation: a worldwide survey of current clinical practice. *J Heart Lung Transplant*. 1998; 17: 525-31.
57. Müller C, Fürst H, Reichenspurner H, Briegel J, Groh J, Reichart B, et al. Lung procurement by low-potassium dextran and the effect on preservation injury. *Transplantation*. 1999; 68: 1139-43.

58. Fischer S, Matte-Martyn A, de Perrot M, Waddell TK, Sekine Y, Hutcheon M, et al. Low-potassium dextran preservation solution improves lung function after human lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 121: 594-6.
59. Strüber M, Wilhelmi M, Harringer W, Niedermeyer J, Anssar M, Künsebeck A, et al. Flush perfusion with low-potassium dextran solution improves early graft function in clinical lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001; 19: 190-4.
60. Aziz TM, Pillay TM, Corris PA, Forty J, Hilton CJ, Hasan A, et al. Perfadex for clinical lung procurement: is it an advance? *Ann Thorac Surg.* 2003; 75: 990-5.
61. Rabanal JM, Ibañez AM, Mons R, Gonzalez AM, Carbajo M, Ortega J, et al. Influence of preservation solution on early lung function (Euro-Collins vs Perfadex). *Transplant Proc.* 2003; 35: 1938-9.
62. Nath DS, Walter AR, Johnson AC, Radosevich DM, Prekker ME, Herrington CS, et al. Does Perfadex affects outcomes in clinical lung transplantation? *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24: 2243-8.
63. Oto T, Griffiths AP, Rosenfeldt F, Levvey BJ, Williams TJ, Snell GI. Early outcomes comparing Perfadex, Euro-Collins, and Papworth solutions in lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2006; 82: 1842-8.
64. Soares PRO, Braga KAO, Nepomuceno NA, Pazetti R, Correia AT, Cardoso PFG, 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; 43: 84-8.

65. Jones MT, Hsieh C, Yoshikawa K, Patterson GA, Cooper JD. A new model for assessment of lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988; 96: 608-14.
66. Wang LS, Yoshikawa K, Miyoshi S, Nakamoto K, Hsieh CM, Yamazaki F, et al. The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a simple *ex vivo* rabbit model used for functional assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989; 98: 333-42.
67. DeCampos KN, Waddell TK, Slutsky KS, Post M, Patterson GA. Assessment of postpreservation rat lung function using a new model for extended venous reperfusion. *J Appl Physiol.* 1993; 75(4): 1890-6.
68. Pego-Fernandes PM, Werebe EC, Cardoso PFG, Pazetti R, Oliveira KA, Soares PRO, et al. Modelo experimental de perfusão pulmonar isolada em ratos: técnica e aplicações em estudos de preservação pulmonar. *J Bras Pneumol.* 2010; 36(4): 490-3.
69. Cypel M, Rubacha M, Yeung J, Hirayama S, Torbicki K, Madonik M, et al. Normothermic *ex vivo* perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. *Am J Transplant.* 2009; 9: 1-8.
70. Steen S, Sjöberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet.* 2001; 357: 825-9.
71. Steen S, Liao Q, Wierup PN, Bolys R, Pierre L, Sjöberg T. Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment *ex vivo*. *Ann Thorac Surg.* 2003; 76: 244-52.
72. Egan TM, Haithcock JA, Nicotra WA, Koukoulis G, Inokawa H, Sevala M, et al. *Ex vivo* evaluation of human lungs for transplant suitability. *Ann Thorac Surg.* 2006; 81: 1205-13.

73. Wierup P, Haraldsson A, Nilsson F, Pierre L, Scherstén H, Silverborn M, et al. *Ex vivo* evaluation of nonacceptable donor lungs. *Ann Thorac Surg.* 2006; 81: 460-6.
74. Yeung JC, Cypel M, Waddell TK, Raemdonck DV, Keshafjee S. Update on donor assessment, resuscitation and acceptance criteria, including novel techniques – non-heart-beating donor lung retrieval and *ex vivo* donor lung perfusion. *Thorac Surg Clin.* 2009; 19: 261-74.
75. Steen S, Ingemansson R, Eriksson L, Pierre L, Algotsson L, Wierup P, et al. First human transplantation of a nonacceptable donor lung after reconditioning *ex vivo*. *Ann Thorac Surg.* 2007; 83: 2191-5.
76. Ingemansson R, Eyjolfsson A, Mared L, Pierre L, Algotsson L, Ekmehag B, et al. Clinical transplantation of initially rejected donor lungs after reconditioning *ex vivo*. *Ann Thorac Surg.* 2009; 87: 255-60.
77. Cypel M, Yeung JC, de Perrot M, Karolak W, Chen F, Sato M, et al. *Ex vivo* lung perfusion in clinical lung transplantation – the HELP trial. *J Heart Lung Transplant.* 2010; 29(2S): S88.
78. Cypel M, Yeung JC, Hirayama S, Rubacha M, Fischer S, Anraku M, et al. Technique for prolonged normothermic *ex vivo* lung perfusion. *J Heart Lung Transplant.* 2008; 27: 1319-25.
79. Pego-Fernandes PM, Medeiros IL, Mariani AW, Fernandes FG, Unterpertinger FV, Samano MN, et al. Perfusão pulmonar *ex vivo*: experiência nacional inicial. *J Bras Pneumol.* 2009; 35(11): 1107-11.
80. Pego-Fernandes PM, Medeiros IL, Mariani AW, Fernandes FG, Unterpertinger FV, Samano MN, et al. *Ex vivo* lung perfusion: early report of brazilian experience. *Transplant Proc.* 2010; 42: 440-3.

81. Pego-Fernandes PM, Mariani AW, Medeiros IL, Pereira AEA, Fernandes FG, Unterpertinger FV, et al. Avaliação e recondicionamento pulmonar *ex vivo*. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2010; 25(4): 441-6.
82. Hino K, Grogan JB, Hardy JD. Viability of stored lungs. Transplantation. 1968; 6: 25-32.
83. Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM, Cardella JA, Cutz E, Edwards V, et al. Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation. Ann Surg. 2000; 231(3): 424-31.
84. Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, et al. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 162: 1932-9.