

**César Augusto Melo e Silva**

**Influência das Propriedades Mecânicas e  
da Arquitetura Alveolar de Pulmões  
Preservados na Patogênese da Lesão de  
Reperfusão Pulmonar**

Brasília, 2006

---

**Universidade de Brasília – UnB  
Faculdade de Medicina – FM  
Pós-Graduação em Ciências Médicas  
Laboratório de Fisiologia Respiratória Experimental**

# **Influência das Propriedades Mecânicas e da Arquitetura Alveolar de Pulmões Preservados na Patogênese da Lesão de Reperfusão Pulmonar**

Doutorando: César Augusto Melo e Silva

Orientador: Prof. Dr. Paulo Tavares

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília – UnB como Parte dos Requisitos Exigidos para a Obtenção do Grau de Doutor em Ciências Médicas.

Brasília, 2006

"... Força nenhuma no mundo interfere  
Sobre o poder da criação  
Não, não precisa se estar nem feliz nem aflito  
Nem se refugiar em lugar mais bonito  
Em busca da inspiração  
Não, ela é uma luz que chega de repente  
Com a rapidez de uma estrela cadente  
Que acende a mente e o coração ..."

João Nogueira

# Dedicatória

À minha mãe Leoni Ferreira de Melo  
e ao meu irmão Thadeu de Jesus e Silva Filho.

---

## Agradecimentos

Para a elaboração e execução dessa tese, a cooperação de algumas pessoas foi fundamental.

A elas expresso meu profundo agradecimento:

- Ao Prof. Dr. Paulo Tavares, meu orientador, por todo incentivo dado no decorrer destes 10 anos em que pesquisei e estudei no Laboratório de Fisiologia Respiratória Experimental da Universidade de Brasília. Suas lições de função pulmonar básica, a lucidez e o cuidado com a minha formação são incomensuráveis. Prof. Paulo, muito obrigado, valeu mesmo!!!!!!!!!!
- Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Assis Viegas por todo estímulo, crédito e sobretudo pelo respeito às diferenças praticados ao longo desta travessia.
- Ao Prof. Dr. Kleber Nogueira de Campos pela incomensurável ajuda, acolhida e pelas divertidas aulas em seu escritório;
- Ao Prof. Dr. Walter Araújo Zin por ter, prontamente, disponibilizado a estrutura de seu laboratório para a realização da análise morfométrica dos pulmões estudados neste projeto;
- Ao Prof. Dr. Paulo Beraldo e à Profa. Dra. Veronica Amado pela ajuda dispensada na qualificação deste trabalho;
- A meu pai, Thadeu de Jesus e Silva, pelo seu amor e carinho;
- À Fernanda Ribeiro, pelo seu amor, dedicação e pela compreensão da minha ausência nas inúmeras e incontáveis horas que dediquei ao trabalho acadêmico, para conseguir chegar até aqui e escrever este singelo agradecimento;
- Ao amigo Sérgio Leite; valeu por tudo mesmo!!!!!!!!!!
- Ao Ronaldo, pela companhia e companheirismo durante todas as horas de laboratório dedicadas a este experimento;

- 
- Ao Rodrigo Storck Carvalho que sem sua ajuda em todas as etapas deste projeto, tenho certeza, tudo teria sido muito mais difícil. Sua ajuda foi incomensurável. Valeu mesmo!!!!!!!!!!!!
  - À Nara Moreira Peixoto, cuja ajuda na primeira fase desta tese foi imprescindível;
  - Ao amigo Antônio Duarte, o Dudu, por sua amizade e presteza para discutir as estratégias utilizadas para ventilar mecanicamente os pulmões estudados;
  - Aos amigos Eduardo Gaio e Marcelo Palmeira, pela amizade e companheirismo;
  - À equipe de Pneumologia do Hospital Universitário de Brasília – HUB;
  - Ao amigo Marcello Roza por ter emprestado equipamentos utilizados na realização deste trabalho e, além de tudo, pela amizade;
  - Aos amigos Jefferson e Zaconeta;
  - À Viviane Cagido que dedicou parte do seu tempo para a análise morfométrica das lâminas;
  - À Márcia Portella, que me "manteve respirando" no momento mais árduo desta travessia;
  - Aos amigos Humberto Alves e Flávio Brito;
  - À Bruna de Melo Bacchini, minha prima, pela fundamental ajuda no experimentos-piloto deste trabalho;
  - Ao amigo Luís Vicente pela confiança desde cedo dispensada a mim.

## Resumo

**Introdução:** Os fatores mecânicos pulmonares relacionados às vias aéreas e à microvasculatura desempenham papel fundamental no contexto da lesão de isquemia e reperfusão (I/R). O objetivo deste trabalho foi estudar o impacto do *flush* vascular pulmonar (FVP), da isquemia fria e o efeito de estratégias de recrutamento alveolar sobre as propriedades mecânicas e morfométricas e correlacioná-las à função pulmonar durante a reperfusão *ex-vivo*. **Material e Métodos:** 128 ratos da raça Wistar foram divididos em 4 grupos (i) controle: pulmões isolados submetidos a 15 minutos de isquemia à temperatura ambiente; (ii) Flush: pulmões isolados submetidos ao *flush* vascular pulmonar (FVP) com solução de Euro-Collins (EC) e preservados a 4 °C por 10 horas (isquemia fria); (iii) CPT: pulmões isolados submetidos ao FVP com EC e à isquemia fria e que foram recrutados à CPT por 2 minutos antes do início da reperfusão; (iv) VC: pulmões isolados submetidos ao FVP com EC e ventilados com volume corrente (VC) por 10 minutos antes do início da reperfusão. Todos os pulmões foram reperfundidos durante 60 minutos, tempo no qual foram estudadas as trocas gasosas, as propriedades mecânica e hemodinâmica. Ao final da reperfusão, o peso líquido/peso seco foi calculado e a análise morfométrica realizada. Em outra etapa, 40 ratos da raça Wistar foram divididos em 5 grupos: (i) controle: pulmões com sangue; (ii) Flush: pulmões submetidos ao FVP com EC; (iii) Isquemia: pulmões submetidos ao FVP com EC e submetidos à isquemia fria; (iv) CPT: pulmões submetidos ao FVP com EC, submetidos à isquemia fria e recrutados à CPT por 2 minutos; (v) VC: pulmões submetidos ao FVP com EC, submetidos à isquemia fria e ventilados com volume corrente por 10 minutos. A análise das propriedades mecânicas e o estudo morfométrico foram realizados em todos os pulmões dos 5 grupos. **Resultados:** o FVP e a isquemia fria aumentaram (i) a percentagem de área alveolar colapsada, (ii) a dissipação de energia nos componentes viscoelásticos pulmonares e (iii) a elastância estática pulmonar. Estes pulmões desenvolveram edema fulminante durante os primeiros 15 minutos de reperfusão. O recrutamento à CPT e a ventilação com VC atenuaram as alterações mecânicas e morfométricas provocadas pela preservação e evitaram a lesão I/R. Durante a reperfusão, as trocas gasosas, as propriedades mecânica e hemodinâmica dos pulmões recrutados foi similar a dos controle. **Conclusões:** as alterações mecânicas e morfométricas causadas pela preservação pulmonar aumentam a impedância dos pulmões tornando-os mais susceptíveis à lesão I/R, e as manobras de recrutamento alveolar empregadas imediatamente antes do início da reperfusão atenuam as inomogeneidades pulmonares causadas pela preservação e previnem a lesão I/R.

**Palavras-chave:** Euro-Collins; lesão de isquemia e reperfusão; recrutamento alveolar; morfometria alveolar; mecânica ventilatória; reperfusão *ex-vivo*.

## Abstract

**Rationale:** mechanical factors related to the airways and to the pulmonary microvasculature play a fundamental role in the context of ischemic-reperfusion injury (I/R). The goal of this study is to investigate the impact of pulmonary vascular flush (PVF), cold ischemia and alveolar recruitment on the mechanical and morphometrical properties and to correlate these findings and pulmonary hemodynamics and gas exchange during the reperfusion.

**Methods:** 128 Wistar rats were randomly divided into 4 groups: (i) Control: fresh lungs; (ii) Flush: lungs flushed with Euro-Collins solution (EC), preserved at 4 °C for 10 hours (cold ischemia); (iii) TLC: flushed lungs, preserved at 4 °C for 10 hours, inflated to TLC for 2 minutes prior to rapid reperfusion; (iv) VT: flushed lungs preserved at preserved at 4 °C for 10 hours, ventilated with tidal volume during 10 minutes prior to rapid reperfusion. All lungs were subjected to an *ex-vivo* reperfusion during 60 minutes. In this period, the gas exchange, the mechanical and hemodynamical properties were evaluated and, at the end, the wet-to-dry ratio was calculated and the morphometrical analysis performed. In other phase, 40 Wistar rats were randomly divided in 5 groups: (i) Control: fresh lungs; (ii) Flush: lungs flushed with EC; (iii) Ischemia: flushed lungs, preserved at 4 °C for 10 hours; (iv) TLC: flushed lungs, preserved at 4 °C for 10 hours, inflated to TLC for 2 minutes; (v) VT: flushed lungs preserved at 4 °C for 10 hours, ventilated with tidal volume during 10 minutes. The end-inflation occlusion method was used to evaluate mechanical properties of the lungs. The morphometrical analysis was also performed. **Results:** PVF and cold ischemia increased (i) the percentage of alveolar collapsed area; (ii) the energy dissipation on the lung viscoelastic components and (iii) the pulmonary lung elastance. These lungs (ischemic not subjected to alveolar recruitment prior to reperfusion) presented severe pulmonary edema, whereas the function of the recruited lungs were similar to that of fresh lungs. **Conclusions:** cold preservation increases pulmonary impedance and the huffiness to the I/R injury, and the alveolar recruitment manoeuvres performed before the reperfusion reverts, or at least, decreases the pulmonary inhomogeneities caused by the preservation and warns the I/R injury.

**Key-words:** Euro-Collins solution; ischemic-reperfusion injury; alveolar recruitment; alveolar morphology; ventilatory mechanics; *ex-vivo* reperfusion.



# Sumário

Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xiv
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 Objetivos</b>	<b>8</b>
2.1 Objetivo Geral . . . . .	8
2.2 Objetivos Específicos . . . . .	8
2.2.1 Fase 1 . . . . .	8
2.2.2 Fase 2 . . . . .	8
2.2.3 Fase 3 . . . . .	8
<b>3 Material e Métodos</b>	<b>9</b>
3.1 Fase 1 . . . . .	13
3.1.1 Animais Utilizados . . . . .	13
3.1.2 Caracterização dos Grupos . . . . .	13
3.1.3 Técnica de Extração dos Blocos Coração-Pulmões . . . . .	13
3.1.4 O Circuito de Reperfusão Pulmonar Isolada <i>ex-vivo</i> . . . . .	14
3.1.5 Estudo das Trocas Gasosas . . . . .	18
3.1.6 Medida das Propriedades Mecânicas . . . . .	18
3.1.7 Hemodinâmica Pulmonar . . . . .	22
3.1.8 Quantificação do Edema Pulmonar . . . . .	22
3.1.9 Fixação dos Pulmões e Preparo das Lâminas . . . . .	22

3.1.10	Análise Morfométrica . . . . .	23
3.1.11	Aquisição dos Sinais . . . . .	23
3.1.12	Análise Estatística . . . . .	26
3.2	Fase 2 . . . . .	27
3.2.1	Animais Utilizados . . . . .	27
3.2.2	Caracterização dos Grupos . . . . .	27
3.2.3	<i>Flush</i> Vascular Pulmonar . . . . .	28
3.2.4	Protocolo Experimental . . . . .	28
3.2.5	Avaliação das Trocas Gasosas, das Propriedades Mecânicas, da Hemo- dinâmica e da Relação Peso Líquido/Peso Seco dos Pulmões . . . . .	29
3.2.6	Análise Morfométrica . . . . .	29
3.2.7	Análise Estatística . . . . .	29
3.3	Fase 3 . . . . .	30
3.3.1	Animais Utilizados . . . . .	30
3.3.2	Caracterização dos Grupos . . . . .	31
3.3.3	Técnica de Extração dos Blocos Coração-Pulmões . . . . .	31
3.3.4	Medidas das Propriedades Mecânicas . . . . .	31
3.3.5	Análise Morfométrica . . . . .	33
3.3.6	Aquisição dos Sinais . . . . .	35
3.3.7	Análise Estatística . . . . .	35
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>36</b>
4.1	Fase 1 . . . . .	36
4.1.1	Estudo das Trocas Gasosas . . . . .	36
4.1.2	Propriedades Mecânicas . . . . .	37
4.1.3	Hemodinâmica Pulmonar . . . . .	38
4.1.4	Relação Peso líquido/Peso seco . . . . .	38
4.1.5	Análise Morfométrica . . . . .	41
4.2	Fase 2 . . . . .	43
4.2.1	Estudo das Trocas Gasosas . . . . .	43
4.2.2	Propriedades Mecânicas . . . . .	46

---

4.2.3	Hemodinâmica Pulmonar . . . . .	46
4.2.4	Relação Peso líquido/Peso seco . . . . .	49
4.2.5	Análise Morfométrica . . . . .	50
4.3	Fase 3 . . . . .	54
4.3.1	Propriedades Mecânicas . . . . .	54
4.3.2	Análise Morfométrica . . . . .	57
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>72</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>73</b>

## Lista de Figuras

1	Representação esquemática do desenho do estudo . . . . .	11
2	Modelo de reperfusão isolada <i>ex-vivo</i> pulmão-para-pulmão (P-P) . . . . .	17
3	Modelo linear unicompartmental . . . . .	21
4	Exemplo de traçado dos sinais captados durante a reperfusão . . . . .	25
5	Modelo linear bicompartimental . . . . .	34
6	Exemplo de traçado dos sinais de fluxo aéreo, pressão traqueal e volume captados durante manobra de oclusão das vias aéreas ao final da inspiração .	34
7	Elastância dos pulmões-estudo e desoxigenadores durante as reperfusões da fase 1 . . . . .	39
8	Resistência total dos pulmões-estudo e desoxigenadores durante as reperfusões da fase 1 . . . . .	39
9	Pressão média da artéria pulmonar dos pulmões-estudo e desoxigenadores durante as reperfusões da fase 1 . . . . .	40
10	Resistência vascular pulmonar dos pulmões-estudo e desoxigenadores durante as reperfusões da fase 1 . . . . .	40
11	Peso líquido/peso seco dos pulmões estudados na fase 1 . . . . .	41
12	Análise morfométrica dos pulmões-estudo e desoxigenadores realizada ao final das reperfusões da fase 1 . . . . .	41
13	Fotomicrografia do pulmão-estudo . . . . .	42
14	Fotomicrografia do pulmão-desoxigenador . . . . .	42
15	Pressão parcial arterial de oxigênio dos grupos estudados na fase 2 . . . . .	45
16	Fração de <i>shunt</i> dos grupos estudados na fase 2 . . . . .	45
17	Elastância pulmonar dos quatro grupos estudados na fase 2 . . . . .	47
18	Resistência pulmonar dos quatro grupos estudados na fase 2 . . . . .	47
19	Pressão arterial pulmonar média dos quatro grupos estudados na fase 2 . . . .	48
20	Resistência vascular pulmonar dos quatro grupos estudados na fase 2 . . . . .	48
21	Peso líquido/peso seco dos quatro grupos estudados na fase 2 . . . . .	51
22	Porcentagem de área alveolar normal dos pulmões estudados na fase 2 . . . .	51
23	Porcentagem de área alveolar colapsada dos pulmões estudados na fase 2 . .	52

---

24	Porcentagem área alveolar hiperinsuflada dos pulmões estudados na fase 2 . . . . .	52
25	Fotomicrografia dos pulmões estudados na fase 2 . . . . .	53
26	Fluxo aéreo administrado durante a ventilação mecânica para medida das propriedades mecânicas pulmonares . . . . .	55
27	Volume administrado durante a ventilação mecânica para medida das propriedades mecânicas pulmonares . . . . .	55
28	Dissipação de energia no componente viscoso pulmonar . . . . .	56
29	Dissipação de energia no componente viscoelástico pulmonar . . . . .	56
30	Elastância estática . . . . .	58
31	Porcentagem de área alveolar normal dos pulmões estudados na fase 3 . . . . .	58
32	Porcentagem de área alveolar colapsada dos pulmões estudados na fase 3 . . . . .	60
33	Porcentagem de área alveolar hiperinsuflada dos pulmões estudados na fase 3 . . . . .	60
34	Fotomicrografias representativas do parênquima dos pulmões estudados na fase 3 . . . . .	61

## Lista de Tabelas

1	Divisão dos grupos, número de blocos-estudo, intervenções específicas e variáveis estudadas em cada fase do projeto . . . . .	12
2	Alterações técnicas efetuadas no modelo de reperfusão P-P em relação à descrição original . . . . .	16
3	Variáveis gasométricas e fração de <i>shunt</i> dos blocos-estudo obtidas durante as reperfusões da fase 1 . . . . .	37
4	Variáveis gasométricas dos blocos-desoxigenadores obtidas durante as reperfusões da fase 1 . . . . .	37
5	Variáveis gasométricas dos blocos-desoxigenadores obtidas durante as reperfusões da fase 2 . . . . .	44

## Lista de Abreviaturas

ANOVA – Análise de variância

AP – Artéria pulmonar

AE – Átrio esquerdo

$\text{NaHCO}_3^-$  – Bicarbonato de sódio

CPT – Capacidade pulmonar total

CRF – Capacidade residual funcional

$\text{NaCl}^-$  – Cloreto de sódio

$\text{Cl}^-$  – Cloro

$\tau$  – Constante de tempo

$\text{CaO}_2$  – Conteúdo arterial de oxigênio

$\text{Cc}'\text{O}_2$  – Conteúdo capilar de oxigênio

$\text{C}\bar{\text{v}}\text{O}_2$  – Conteúdo venoso de oxigênio

$\dot{Q}_t$  – Débito cardíaco

$\Delta P_1$  – Dissipação pressórica necessária para vencer as resistências newtonianas das vias aéreas

$\Delta P_2$  – Dissipação pressórica nos componentes viscoelásticos e inomogeneidades dos tecidos pulmonares

E – Elastância

$E_{\text{dyn}}$  – Elastância dinâmica

H – Elastância do tecido pulmonar

$E_{\text{st}}$  – Elastância estática

$\text{TNF-}\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

FVP – *Flush* vascular pulmonar

$\dot{V}$  – Fluxo aéreo

$\dot{Q}_s$  – Fluxo sanguíneo pela fração *shuntada* do débito cardíaco

$\dot{Q}_p$  – Fluxo sanguíneo pulmonar

$\dot{Q}_s/\dot{Q}_t$  – Fração de *shunt*

$\text{FiO}_2$  – Fração inspirada de oxigênio

FR – Frequência respiratória

CO<sub>2</sub> – Gás carbônico

HE – Hematoxilina-eosina

HUB – Hospital Universitário de Brasília

INF- $\gamma$  – Interferon-gama

IL – Interleucinas

Lesão I/R – Lesão de isquemia e reperfusão

LPA – Lesão pulmonar aguda

LPD – *Low potassium dextran*

N<sub>2</sub> – Nitrogênio

O<sub>2</sub> – Oxigênio

PL/PS – Peso líquido/peso seco

K<sup>+</sup> – Potássio

pH – Potencial hidrogeniônico

P<sub>A</sub>O<sub>2</sub> – Pressão parcial alveolar de oxigênio

PaCO<sub>2</sub> – Pressão parcial arterial de gás carbônico

PaO<sub>2</sub> – Pressão parcial arterial de oxigênio

P<sub>AP</sub> – Pressão da artéria pulmonar

P<sub>AP</sub> – Pressão da artéria pulmonar média

Pao – Pressão na abertura das vias aéreas

PEEP – Pressão positiva ao final da expiração

Pel – Pressão de retração elástica

P<sub>TP</sub> – Pressão transpulmonar

PvCO<sub>2</sub> – Pressão parcial venosa de gás carbônico

PvO<sub>2</sub> – Pressão parcial venosa de oxigênio

P-V – Pressão-volume

P-P – Pulmão-para-pulmão

$\dot{V}_A/\dot{Q}$  – Relação ventilação/perfusão

R – Resistência

Rinit – Resistência das vias aéreas

Req – Resistência do equipamento



Rtis – Resistência do tecido pulmonar  
RVP – Resistência vascular pulmonar  
SaO<sub>2</sub> – Saturação arterial de oxigênio  
S<sub>v</sub>O<sub>2</sub> – Saturação venosa de oxigênio  
SDRA – Síndrome do desconforto respiratório agudo  
Na<sup>+</sup> – Sódio  
t – Tempo  
Te – Tempo expiratório  
Ti – Tempo inspiratório  
UnB – Universidade de Brasília  
UW – Universidade de Wiscosin  
VCI – Veia cava inferior  
 $\dot{V}_A$  – Ventilação alveolar  
 $\dot{V}_E$  – Ventilação minuto  
VE – Ventrículo esquerdo  
V – Volume  
VC – Volume corrente

# 1 Introdução

O transplante pulmonar é hoje uma realidade terapêutica para pacientes portadores de doenças pulmonares crônicas e terminais [1]. Os estudos clínicos e experimentais têm focado três grandes aspectos envolvidos no transplante: (i) os técnicos relacionados ao procedimento cirúrgico, (ii) os danos estruturais e funcionais causados pela isquemia e pelo restabelecimento dos fluxos aéreo e sanguíneo durante o procedimento de reimplante e (iii) na prevenção da rejeição, particularmente da rejeição crônica presente em graus variáveis na maioria dos pacientes que experimentam sobrevida de longo prazo. Os dois primeiros aspectos estão relacionados à preservação dos pulmões que serão reimplantados. Embora esta área tenha sido objeto de pesquisas nas últimas três décadas, ainda não há consenso acerca da melhor maneira para preservação pulmonar, e a disfunção causada pela lesão de isquemia e reperfusão (I/R) ainda permanece como a principal causa de morbidade e mortalidade na fase inicial do transplante [2]. Infelizmente, com os métodos de preservação atuais, o período máximo de isquemia fria tolerável permanece na faixa de 6-9 horas, o que não somente limita a realização ou a aplicação do procedimento, como também faz com que o transplante pulmonar continue sendo um procedimento realizado em caráter de urgência, com os óbvios inconvenientes logísticos a isso associados, diferentemente dos transplantes hepático e renal, por exemplo, que já podem ser realizados eletivamente. As tentativas de se estender esse período crítico de isquemia fria resultam na falência primária do enxerto pulmonar, que é o resultado final de um complexo processo de lesão tecidual orgânica que se inicia com a morte encefálica do doador e se estende até o momento em que a reperfusão pulmonar é iniciada [3].

Desde o relato de Cooper e cols. do primeiro transplante clínico realizado com sucesso e sobrevida de longo prazo [4], refinamentos das técnicas de preservação aumentaram, significativamente, a aplicação e a viabilidade do transplante pulmonar. Atualmente, a preservação dos pulmões se inicia com um *flush* vascular pulmonar realizado com soluções de preservação a 4 °C, seguida de um período de armazenamento hipotérmico do órgão. Os objetivos do *flush* vascular pulmonar com soluções de preservação são: (i) resfriar uniformemente o tecido pulmonar e (ii) remover do leito vascular pulmonar os elementos

diferenciados do sangue para evitar a formação de trombos e prevenir as lesões celulares promovidas por neutrófilos, macrófagos e plaquetas retidos na circulação pulmonar durante a preservação. As soluções de preservação incluem as do tipo intracelular, da qual são exemplos, as soluções de Euro-Collins e da Universidade de Wiscosin (UW), e as do tipo extracelular, como as soluções *Low-Potassium Dextran* – LPD e a Celsior. As do tipo intracelular possuem, em sua composição, altas concentrações de potássio ( $K^+$ ) e baixas concentrações de sódio ( $Na^+$ ) e cloro ( $Cl^-$ ). A justificativa fisiológica para o uso dessas soluções é a de que durante a preservação a frio, há inativação da bomba de sódio-potássio ( $Na^+/K^+$ ) [5, 6]. A presença no espaço vascular e extracelular de uma solução, cuja concentração de eletrólitos é similar à do meio intracelular, minimizará o influxo de  $Na^+$  e de água para o interior das células, evitando, assim, o inchaço celular. Por outro lado, o  $K^+$  é um potente agente vasoconstritor [7] que pode aumentar a resistência vascular pulmonar (RVP) quando os pulmões forem reperfundidos. Para evitar isso, vários autores associaram vasodilatadores à solução de *flush* [8]. Keshavjee e cols. [9] desenvolveram uma solução de preservação específica para os pulmões, a LPD, composta por concentrações de  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Cl^-$  semelhantes às do meio extracelular e adicionaram a esta solução, dextran 40, agente responsável por manter a pressão oncótica capilar para manter a água no espaço intravascular e, então, evitar o edema celular. Em comparação com a solução de Euro-Collins, a LPD apresenta melhores resultados de função pulmonar [9, 10] e é menos citotóxica aos pneumócitos II e às células endoteliais [11].

Apesar da hipotermia estar associada a eventos deletérios ao tecido pulmonar [3], o armazenamento dos pulmões a baixas temperaturas é indispensável para sua preservação. A hipotermia reduz a atividade metabólica celular. Desta forma, as reações bioquímicas e a taxa de degradação de componentes celulares necessários para a viabilidade do órgão são reduzidas a um nível em que esta viabilidade pode ser mantida, mesmo os pulmões estando em isquemia. A temperatura ideal para o armazenamento pulmonar ainda é controversa. Os resultados do trabalho de Wang e cols. [6] demonstram que a função dos pulmões após 12 horas de armazenamento a  $10^{\circ}C$  é melhor do que a dos armazenados a  $4^{\circ}C$  ou  $15^{\circ}C$ , muito embora a logística dos procedimentos utilizados para o transplante torne  $4^{\circ}C$  a temperatura mais utilizada clinicamente [7].

A lesão pulmonar I/R tem sido identificada como a principal causa de falência do enxerto [2]. Sua etiologia é multifatorial e seu mecanismo fisiopatológico complexo. Neste contexto, dois enfoques têm sido estudados: (i) as repostas bioquímicas/humorais relacionadas ao período de isquemia e à reperfusão e (ii) os aspectos mecânicos envolvidos neste processo.

As repostas bioquímicas/humorais relacionadas à isquemia e à reperfusão são as que têm recebido maior atenção na literatura. Durante o processo de isquemia, alguns eventos podem ocorrer, tais como: (i) formação de espécies reativas de oxigênio responsáveis por reagir com lipídeos das membranas celulares [12, 13, 14]; (ii) inativação da bomba de sódio e potássio [5, 6], mecanismo responsável pela manutenção eletrolítica do meio intracelular; (iii) influxo de cálcio [15] associado à alteração do pH do meio intracelular e interrupção de processos que causam morte celular; (iv) liberação de ferro, que possui alta habilidade para participar na geração de oxidantes [16] e (v) morte celular.

Estudos experimentais demonstram que a isquemia e a reperfusão induzem à rápida liberação de citocinas pró-inflamatórias [17, 18]. A isquemia dispara a ativação de macrófagos que liberam citocinas e medeiam a fase inicial da lesão de reperfusão. As interleucinas (IL) 8, 12, 18, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o interferon-gama (INF- $\gamma$ ) liberados pelos macrófagos são responsáveis por ativar os linfócitos-T e os neutrófilos que, por sua vez, disparam a fase tardia da lesão e perpetuam o danos teciduais pulmonares [19].

Por outro lado, as investigações relacionadas com as modificações pulmonares que ocorrem no período de isquemia, e sua contribuição na patogênese da lesão pulmonar I/R, estão em menor número.

É fato que os fatores mecânicos do parênquima e da microvasculatura pulmonar desempenhem papel fundamental no contexto da lesão I/R, visto que o funcionamento dos pulmões depende, criticamente, da atuação cíclica de forças mecânicas. Vários autores têm demonstrado, em diferentes modelos experimentais, que (i) o grau de insuflação pulmonar durante o período de preservação [20, 21, 22], (ii) o fluxo de reperfusão [23, 24, 25], (iii) a velocidade de reperfusão [23] e (iv) o grau de dilatação da microvasculatura pulmonar [26] são fatores importantes na gênese da lesão I/R, embora o papel destes fatores ainda não esteja

devidamente elucidado.

Os pulmões são órgãos singulares em termos de estrutura anatômica e fisiologia. O movimento e as alterações físicas a ele relacionadas são pontos indissociáveis de sua fisiologia. Desde a décima semana de gestação já é possível observar "movimentos respiratórios". As forças físicas exercem papel fundamental na regulação da estrutura, da função e do metabolismo pulmonar [3]. Estas forças estão relacionadas à regulação da proliferação celular [27, 28], ao metabolismo do surfactante [29], à permeabilidade celular [30] e à liberação de mediadores inflamatórios [31, 32].

No contexto da preservação pulmonar, os pulmões recebem em sua circulação um *flush* com solução de preservação para a retirada dos elementos diferenciados do sangue para, então, serem armazenados em condições estáticas hipotérmicas [19]. Tanto o *flush* quanto o armazenamento em condições estáticas hipotérmicas têm como objetivo reduzir o metabolismo tecidual [15], portanto, são essenciais para a ótima preservação do órgão. Contudo, estas duas condições são estranhas aos pulmões porque (i) há abolição da pressão capilar [33] e (ii) há interrupção da variação cíclica a qual os pulmões são submetidos desde sua embriogênese.

Estudos com ratos [34, 35] e coelhos [26, 36] demonstram que o emprego de estratégias mecânicas utilizadas no período de preservação [37, 38, 39, 40] e pré-reperusão [23, 34] previnem a lesão pulmonar I/R.

O ótimo grau de insuflação nos quais os pulmões devem ser mantidos durante a isquemia fria foi estabelecido por DeCampos e cols. [41]. Estes autores demonstraram que quando os pulmões foram insuflados e armazenados a 50% da capacidade pulmonar total (CPT), as trocas gasosas e as propriedades hemodinâmicas após a reperusão foram melhores do que as apresentadas por aqueles que foram armazenados colapsados ou insuflados a 25% ou na CPT. Esses resultados mostraram a importância da manutenção do volume pulmonar durante o período de isquemia na prevenção da lesão I/R. Entretanto, os autores supracitados não estabeleceram os mecanismos pelos quais a manutenção do volume pulmonar durante a preservação defende os pulmões. Shütte e cols. [26], em estudo com coelhos, em vez de preservarem os pulmões em condições estáticas, optaram por ventilá-los durante o período

de isquemia. Esta manobra evitou a formação de edema alveolar e a hipertensão pulmonar associadas à lesão I/R. Outros autores estudaram o efeito da insuflação dos pulmões com diferentes tipos de gases durante o período de isquemia fria. Weder e cols. [42] pensaram na hipótese de que a utilização de nitrogênio ( $N_2$ ) na via aérea durante o período de isquemia atenuaria a lesão I/R mediada pela formação de radicais-livre de oxigênio ( $O_2$ ). Nesse estudo, contrariamente à hipótese, os pulmões preservados com 100% de  $N_2$  desenvolveram edema fulminante imediatamente após o início da reperfusão. As trocas gasosas dos pulmões que foram preservados com 100% de  $O_2$  foi superior às dos preservados com ar ambiente. Não há dúvida de que, mesmo isolados e submetidos à hipotermia, os pulmões necessitam de  $O_2$  e continuam metabolicamente ativos. Entretanto, é tênue a linha que separa a necessidade de oxigênio para o metabolismo celular das altas concentrações que podem levar à formação de radicais-livre de  $O_2$ .

Pierre e cols. [23] testaram a hipótese de que a velocidade do restabelecimento do fluxo sangüíneo é um fator crítico na gênese da lesão I/R. Nesse estudo, os autores investigaram os efeitos do abrupto e do lento restabelecimento do fluxo sangüíneo na função de pulmões submetidos e não submetidos à isquemia e mostraram que (i) a fração de *shunt* e a relação peso líquido/peso seco (PL/PS) dos pulmões isquêmicos expostos à reperfusão rápida foi significativamente maior que a dos isquêmicos submetidos ao restabelecimento gradual da perfusão, e (ii) a função dos pulmões que não foram submetidos à isquemia foi similar a dos isquêmicos reperfundidos lentamente. Com uso de microscopia eletrônica, os autores demonstraram que o abrupto restabelecimento do fluxo sangüíneo de pulmões isquêmicos descolou o epitélio alveolar da membrana basal. Esta alteração ultraestrutural não ocorreu naqueles pulmões não submetidos à isquemia e nos isquêmicos que foram reperfundidos lentamente. Estes achados sugerem que o dano estrutural causado pela reperfusão resulta, pelo menos em parte, da interação entre a isquemia e a hemodinâmica pulmonar. Diversos outros autores [43, 44] apontam para a importância das condições hemodinâmicas na prevenção e na gênese da lesão I/R. O que não está elucidado é se a lesão está associada a altas taxas de fluxo ou ao aumento da resistência vascular pulmonar e da pressão microvascular, visto que é difícil dissociar os efeitos do aumento da velocidade do fluxo sangüíneo e, portanto, do estresse tangencial sobre o endotélio, do aumento da pressão

da artéria pulmonar.

Outro aspecto importante é o comportamento mecânico dos pulmões antes do início da reperfusão. DeCampos e cols. [34] demonstraram que manobras de recrutamento realizadas imediatamente antes do fluxo sanguíneo ser restabelecido eram capazes de proteger os pulmões contra a lesão de I/R. A insuflação pulmonar à CPT ou dez minutos de ventilação com volume corrente preveniram a formação de edema alveolar fulminante e fizeram com que as trocas gasosas dos pulmões submetidos à isquemia fosse similar a de pulmões não submetidos à hipotermia. Os autores especularam que mesmo preservados à 50% da CPT, poderia haver colapso alveolar durante o período de isquemia fria, causado pela contração dos gases submetidos ao frio e pela difusão transpleural dos gases alveolares e, portanto, a presença de atelectasias poderia reduzir o recrutamento capilar no início da reperfusão. Antes do início da reperfusão, a pressão na abertura das vias aéreas ( $P_{ao}$ ) dos pulmões recrutados à CPT foi menor que a dos ventilados com volume corrente por dez minutos, indicando melhor complacência estática dos recrutados à CPT e melhora ou atenuação das perturbações mecânicas pulmonares causadas pelo período de preservação. Os autores ainda especularam que (i) o mecanismo pelo qual a insuflação à CPT e a ventilação por dez minutos realizadas antes da perfusão ser restabelecida melhorava ou atenuava as alterações mecânicas causadas pela preservação era similar: o recrutamento alveolar e (ii) a melhora da complacência estática era crítica para a lesão I/R. Contudo, DeCampos e cols. não elucidaram de que maneira a melhora do comportamento mecânico pulmonar pré-reperfusão protege os pulmões contra a lesão I/R.

Em síntese, existem fortes evidências de que os fatores mecânicos relacionados às vias aéreas e à vasculatura pulmonar desempenham papel fundamental na gênese e também na prevenção da lesão pulmonar de I/R. Estes aspectos ainda não estão suficientemente elucidados na literatura. É possível que a lesão de I/R seja potencialmente evitável e reversível, se intervenções de cunho mecânico forem empregadas para criar condições ótimas de preservação e também se forem utilizadas imediatamente antes e durante o restabelecimento dos fluxos aéreo ( $\dot{V}$ ) e sanguíneo ( $\dot{Q}_p$ ).

A primeira hipótese deste projeto é a de que as técnicas de preservação, e mais especificamente o *flush* vascular pulmonar e a isquemia fria induzam alterações mecânicas

e morfológicas pulmonares potencialmente reversíveis. A segunda hipótese é que estratégias específicas de recrutamento empregadas no período pós-preservação e pré-reperusão restabelecem a mecânica e a morfologia ideais do tecido pulmonar e previnam a lesão I/R.



## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

1. Estudar o impacto do *flush* vascular pulmonar e da isquemia fria sobre as propriedades mecânicas pulmonares e sobre a morfometria alveolar e correlaciona-lo à função pulmonar durante a reperfusão.

### 2.2 Objetivos Específicos

#### 2.2.1 Fase 1

1. Montar e testar, no Laboratório de Fisiologia Respiratória Experimental da Universidade de Brasília - UnB, o modelo modificado de reperfusão pulmonar isolada *ex-vivo* pulmão-para-pulmão (P-P) previamente descrito e validado por DeCampos e cols. [45];

#### 2.2.2 Fase 2

1. Estabelecer o modelo de lesão pulmonar de I/R, ou seja, identificar o período de isquemia crítico e a temperatura de preservação que produzem lesão nos pulmões potencialmente reversível com as estratégias ventilatórias específicas;
2. Estudar os efeitos do recrutamento alveolar à CPT e da ventilação com volume corrente durante dez minutos, ambos realizados imediatamente antes do restabelecimento do fluxo sanguíneo, sobre as trocas gasosas, propriedades mecânicas, hemodinâmica durante 60 minutos de reperfusão, avaliar a relação peso líquido/peso seco e a morfometria alveolar ao final deste período;

#### 2.2.3 Fase 3

1. Relacionar o comportamento mecânico pulmonar à morfometria alveolar de pulmões submetidos ao *flush* vascular pulmonar, à isquemia fria, ao recrutamento alveolar à CPT e à ventilação com volume corrente durante 10 minutos.

### 3 Material e Métodos

Os experimentos deste estudo foram realizados em três fases distintas e complementares, cada qual contendo objetivos e metodologia próprios. A execução das três etapas obedeceu uma sequência lógica necessária para alcançar o principal objetivo do projeto (figura 1).

Na primeira fase, o modelo de reperfusão pulmonar utilizado para a investigação *ex-vivo* das trocas gasosas, das propriedades mecânicas e da hemodinâmica dos pulmões em estudo foi montado e adaptado para as condições do Laboratório de Fisiologia Respiratória Experimental da UnB o que, por questões experimentais e de logística, diferem das condições onde o modelo original foi descrito e validado [45]. Desta maneira, os experimentos da primeira fase deste projeto foram realizados para testar a reprodutibilidade e estabilidade do modelo P-P. As adaptações realizadas foram: (i) utilização de um ventilador de fluxo constante e outro controlado a volume, e não dois controlados a volume; (ii) duas bombas de infusão em vez de uma com dois roletes; (iii) caixa de reperfusão com maiores dimensões; (iv) necessidade de aproximadamente 40 mL de sangue para preencher os circuitos de reperfusão, e não 25 mL como descrito no modelo original; (v) uso de uma válvula redutora de fluxo para alimentação do ventilador de fluxo constante, o que não há na descrição do modelo original; (vi) construção de um "misturador" de gases com uma válvula de escape adaptada à redução do fluxo imposta pela válvula redutora; (vii) perfusão dos dois pulmões do bloco-estudo e não somente de um, como descrito no modelo original; (viii) as análises gasométricas das amostras de sangue foram realizadas somente ao final do experimento no Laboratório de Função Pulmonar do Serviço de Pneumologia do Hospital Universitário de Brasília – HUB (que dista, aproximadamente, 2 km do Laboratório de Fisiologia Respiratória Experimental onde os experimentos foram realizados), e não no momento em que o sangue era coletado; (ix) como não havia, e ainda não há, gasômetro no Laboratório de Fisiologia Respiratória Experimental, o ajuste do pH sangüíneo era feito com base nos experimentos do projeto-piloto e não pela monitorização constante desta variável, (x) introdução da medida da elastância e da resistência total dos pulmões, o que não havia no modelo original e (xi) fluxo sangüíneo de 12 mL.min<sup>-1</sup> e não de 4 mL.min<sup>-1</sup> para os pulmões-estudo.

---

Somente após o total domínio sobre o funcionamento do sistema de reperfusão, com todas as variáveis e condições experimentais devidamente controladas, e com os resultados funcionais consistentes e reproduzíveis, e sobretudo com a garantia que o modelo *per se* não era fonte causadora de dano funcional aos pulmões em estudo, foi iniciada a segunda fase, cujos objetivos foram determinar o modelo de lesão pulmonar de isquemia e reperfusão (I/R) e estudar as repercussões funcionais e estruturais causadas por estratégias ventilatórias empregadas imediatamente antes do início da reperfusão de pulmões isquêmicos.

Com a identificação, na segunda fase, do benefício funcional que as intervenções ventilatórias específicas produziram na prevenção da lesão I/R, foram iniciadas as investigações da fase três. Nesta etapa, as propriedades mecânicas de pulmões submetidos às mesmas condições experimentais da segunda fase foram correlacionadas com as variáveis morfológicas e funcionais para estabelecer as relações entre a forma, o comportamento mecânico e a função dos pulmões estudados. A sequência das três etapas e os objetivos de cada uma estão representados, graficamente, pela figura 1. A tabela 1 apresenta a divisão dos grupos, o número de blocos-estudo, as intervenções específicas e as variáveis estudadas em cada uma das fases.

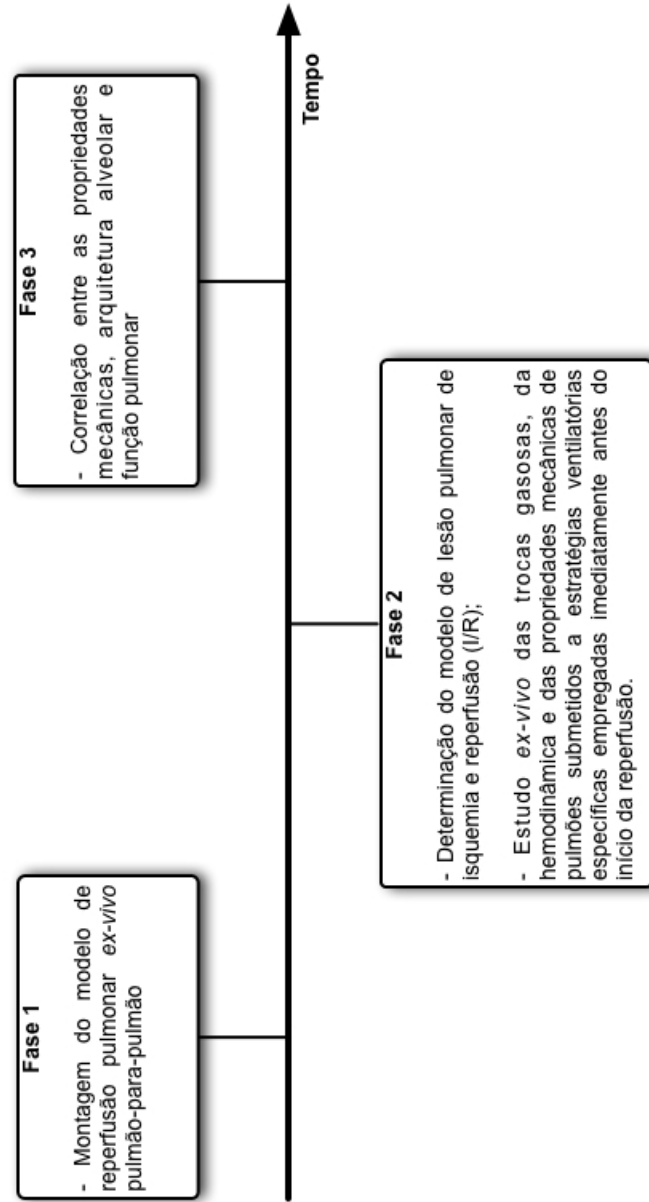


Figura 1: Representação esquemática do desenho do estudo

Tabela 1: Divisão dos grupos, número de blocos-estudo, intervenções específicas e variáveis estudadas em cada fase do projeto

FASE 1										
Grupo	<i>n</i>	FVP	Isquemia Fria	RR	Intervenções	Trocas Gasosas	Mecânica	Hemodinâmica	PL/PS	Morfometria
Controle	10								X	
Estudo	8			X		X	X	X	X	X
Desoxigenador	8			X		X	X	X	X	X
FASE 2										
Controle	8			X		X	X	X	X	X
Isquemia	8	X	X	X		X	X	X	X	X
CPT	8	X	X	X	CPT 2 min	X	X	X	X	X
VC	8	X	X	X	VC 10 min	X	X	X	X	X
FASE 3										
Controle	8								X	X
Flush	8	X					X	X	X	X
Isquemia	8	X	X				X	X	X	X
CPT	8	X	X		CPT 2 min		X	X	X	X
VC	8	X	X		VC 10 min		X	X	X	X

*n* = número de blocos estudados em cada grupo; FVP = *flush* vascular pulmonar com solução de preservação de Euro-Collins; isquemia fria = isquemia fria a 4 °C por 10 horas; RR = rápido restabelecimento do fluxo sanguíneo pulmonar (12 mL.min<sup>-1</sup>); CPT 2 min = insuflação pulmonar a 30 cmH<sub>2</sub>O durante 2 minutos; VC 10 min = ventilação durante 10 minutos com volume corrente de 3 mL; trocas gasosas = estudo do pH, pressões arteriais de oxigênio e gás carbônico (PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, respectivamente), saturação arterial e venosa de oxigênio (SaO<sub>2</sub> e S<sub>v</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente) fração de *shunt*, pressões venosas de oxigênio e de gás carbônico (PvO<sub>2</sub> e PvCO<sub>2</sub>, respectivamente); Mecânica = estudo da elastância e resistência total (fases 1 e 2), dissipação de energia para vencer as resistências newtonianas das vias aéreas e da viscoelasticidade/inomogeneidades pulmonares, elastâncias dinâmica e estática (fase 3); Hemodinâmica = estudo da pressão arterial pulmonar média e da resistência vascular pulmonar; PL/PS = relação peso líquido/peso seco; Morfometria = estudo das porcentagens de área alveolar de tamanho normal, colapsada e hiperinsuflada; X = realizado na fase.

## 3.1 Fase 1

### 3.1.1 Animais Utilizados

Para a realização dos experimentos desta fase, foram utilizados 42 ratos machos, da raça Wistar, adquiridos no Laboratório BioAgri, Planaltina/DF, com peso entre 295 e 320 gramas.

### 3.1.2 Caracterização dos Grupos

**Controle** composto por 10 pulmões isolados, extraídos de animais saudáveis, que não foram submetidos à ventilação e nem à reperfusão *ex-vivo*; estes pulmões foram utilizados somente para o cálculo da relação peso líquido/peso seco;

**Estudo** composto por 8 blocos coração-pulmões submetidos à isquemia em temperatura ambiente por, aproximadamente, 20 minutos e reperfundidos durante 1 hora. Estes pulmões compuseram os blocos-estudo dos experimentos;

**Desoxigenador** composto por 8 blocos coração-pulmões submetidos à isquemia em temperatura ambiente por, aproximadamente, 20 minutos e reperfundidos durante 1 hora. Estes pulmões compuseram os blocos-desoxigenadores dos experimentos.

### 3.1.3 Técnica de Extração dos Blocos Coração-Pulmões

No modelo de circulação pulmonar *ex-vivo* P-P, dois blocos coração-pulmões eram utilizados. O primeiro funcionava como desoxigenador, ou seja, provia, continuamente, sangue venoso para o segundo, o bloco estudo, responsável por transformar o sangue venoso em arterial. Os procedimentos utilizados para a extração dos dois blocos são descritos a seguir.

Inicialmente, os animais foram sedados com diazepam (5 mg i.p.), pesados (balança digital Filizola MF-6, São Paulo, SP) e anestesiados com injeção intraperitoneal de thionembutal sódico (30 mg.kg<sup>-1</sup>). Em seguida, era realizada a traqueotomia, com introdução de uma cânula de polietileno (4,5 cm de comprimento e 2,1 mm de diâmetro interno, com sua

extremidade distal conectada a uma torneira plástica de três vias), fixada à traquéia com fio de seda 3-0. Assim, os ratos eram ventilados mecanicamente no modo volume controlado (Harvard Apparatus 680A, Millis, MA, EUA) com ar ambiente, frequência respiratória (FR) de  $80 \cdot \text{min}^{-1}$ , volume corrente (VC) de  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  e pressão positiva ao final de expiração (PEEP) de  $5 \text{ cmH}_2\text{O}$ .

Ainda em ventilação mecânica, os ratos eram submetidos à laparotomia mediana, seguida de administração, via veia cava inferior (VCI), de heparina sódica ( $1000 \text{ UI} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). O acesso torácico foi realizado através de esternotomia mediana. O timo fora ressecado, os grandes vasos cardíacos expostos e, no tronco da artéria pulmonar (AP), via ventrículo direito, era introduzido um catéter de polietileno (4,5 cm de comprimento e 1,7 mm de diâmetro interno). Após o preenchimento com sangue oriundo da AP, a extremidade distal do catéter era conectada a uma torneira plástica de três vias, previamente preenchida com solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, que tinha como objetivo evitar a entrada de ar na circulação pulmonar. O átrio esquerdo (AE) e o ventrículo esquerdo (VE) eram excisados. Este procedimento evitava oclusão da drenagem venosa pulmonar e permitia fluxo livre do sangue efluente dos pulmões.

Ao final da inspiração, a torneira de três vias da cânula traqueal era ocluída e os pulmões mantidos insuflados. O bloco coração-pulmões era excisado e imediatamente colocado e preservado, em temperatura ambiente, em uma placa de Petri, preenchida com solução fisiológica de NaCl a 0,9%. O bloco era coberto por um pequeno pedaço de filme plástico, para evitar sua desidratação, e permanecia em isquemia à temperatura ambiente por aproximadamente de vinte minutos, tempo necessário para realizar todo procedimento cirúrgico para, então, se iniciar a reperfusão.

### 3.1.4 O Circuito de Reperfusão Pulmonar Isolada *ex-vivo*

Sistemas isolados de perfusão pulmonar são extremamente utilizados na pesquisa experimental para mensurar diversas variáveis da função pulmonar. Suas principais limitações são: (i) eles tendem a ser edemogênicos e (ii) na ausência de recirculação, eles não permitem a medição contínua das trocas gasosas, o indicador mais importante da função

pulmonar no contexto da pesquisa para o transplante de pulmão.

No presente trabalho, optamos por utilizar o modelo de reperfusão pulmonar *ex-vivo* pulmão-para-pulmão (P-P) descrito por DeCampos e cols. [45]. Esse modelo permite a medição prolongada (por até quatro horas), em condições estáveis, de diversas variáveis ligadas à função pulmonar – trocas gasosas inclusive – graças a utilização de um pulmão ou bloco "desoxigenador" que funciona como fonte contínua de sangue venoso (de composição gasosa otimizada) para o sistema. Uma câmara de vidro (38 cm de comprimento, 60 cm de largura e 44 cm de altura) foi especialmente construída para a montagem e funcionamento do modelo de circulação P-P. O calor úmido no interior da câmara era produzido por um banho-maria, ajustado à temperatura de aproximadamente 45 °C e mantido entre 37-38 °C.

O bloco estudo era ventilado em volume controlado (Harvard Apparatus 680A, Millis, MA, EUA), disparado a tempo, limitado e ciclado a volume, alimentado com ar ambiente, FR de 45.min<sup>-1</sup>, VC de 3 mL, ventilação minuto ( $\dot{V}_E$ ) de 135 ml.min<sup>-1</sup> e PEEP de 5 cmH<sub>2</sub>O.

Para ventilar o bloco desoxigenador, foi utilizado ventilador de fluxo constante, disparado, limitado e ciclado a tempo (Samay VR 15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai) alimentado com mistura gasosa hipóxica composta por: 4% de oxigênio (O<sub>2</sub>), 8% de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e 88% de nitrogênio (N<sub>2</sub>). Os parâmetros ventilatórios utilizados foram: FR 85.min<sup>-1</sup>, VC de 4 mL, tempo inspiratório (Ti) de 0,30 s, tempo expiratório (Te) de 0,45 s,  $\dot{V}_E$  de 340 ml.min<sup>-1</sup> e PEEP de 4 cmH<sub>2</sub>O.

Os blocos-estudo e desoxigenador eram posicionados em seus devidos suportes, conectados ao sistema de reperfusão e aos ventiladores mecânicos. O circuito era preenchido com 40 mL de sangue provenientes dos dois ratos doadores dos blocos coração-pulmões e de dois outros utilizados exclusivamente para esta finalidade. A este volume era adicionado 0,5 mL de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a 8,4%, para elevar o pH sangüíneo para faixa de normalidade (7,35 - 7,45). Antes de reperfundir os pulmões, o sangue circulava durante dez minutos por *by-passes* localizados entre as cânulas das artérias pulmonares e os reservatórios arterial e venoso, com o intuito de retirar do sistema eventuais bolhas de ar.

Após o início da reperfusão e da ventilação, o sangue oxigenado proveniente do



bloco-estudo era coletado continuamente no reservatório arterial, aspirado e bombeado, a  $12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  [46], através de bomba de infusão (Nutrimat II, B. Braun, Melsungen AG, Alemanha) para a cânula arterial pulmonar do bloco desoxigenador. Reciprocamente, o efluente desoxinegado, produzido por este bloco era coletado no reservatório venoso, aspirado e bombeado a  $12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (Nutrimat II, B. Braun, Melsungen AG, Alemanha) para a cânula arterial pulmonar do bloco estudo. A cada vinte minutos, era adicionado  $0,1 \text{ mL}$  de  $\text{NaHCO}_3^-$  a 8,4% em cada reservatório. O modelo de reperfusão pulmonar isolada *ex-vivo* P-P está ilustrado na figura 2.

Tabela 2: Alterações técnicas efetuadas no modelo de reperfusão P-P em relação à descrição original

Item	Descrição Original	Modelo Adaptado UnB
Ventilador mecânico	2 a volume	1 a volume e 1 de fluxo constante
Bombas de infusão	1 com duas cabeças	2, uma para cada bloco
Quantidade de sangue	25 mL	40 mL
Válvula redutora de fluxo	Não	Sim
Misturador de gases	Não	Sim, adaptado à válvula redutora de fluxo
Pulmões-estudo reperfundidos	1	2
Gasometrias	no próprio laboratório	a 2 km do laboratório
Ajuste do pH	monitorização no local	resultados do projeto piloto
Fluxo de reperfusão	$4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	$12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Medida da mecânica	impedância total	elastância e resistência

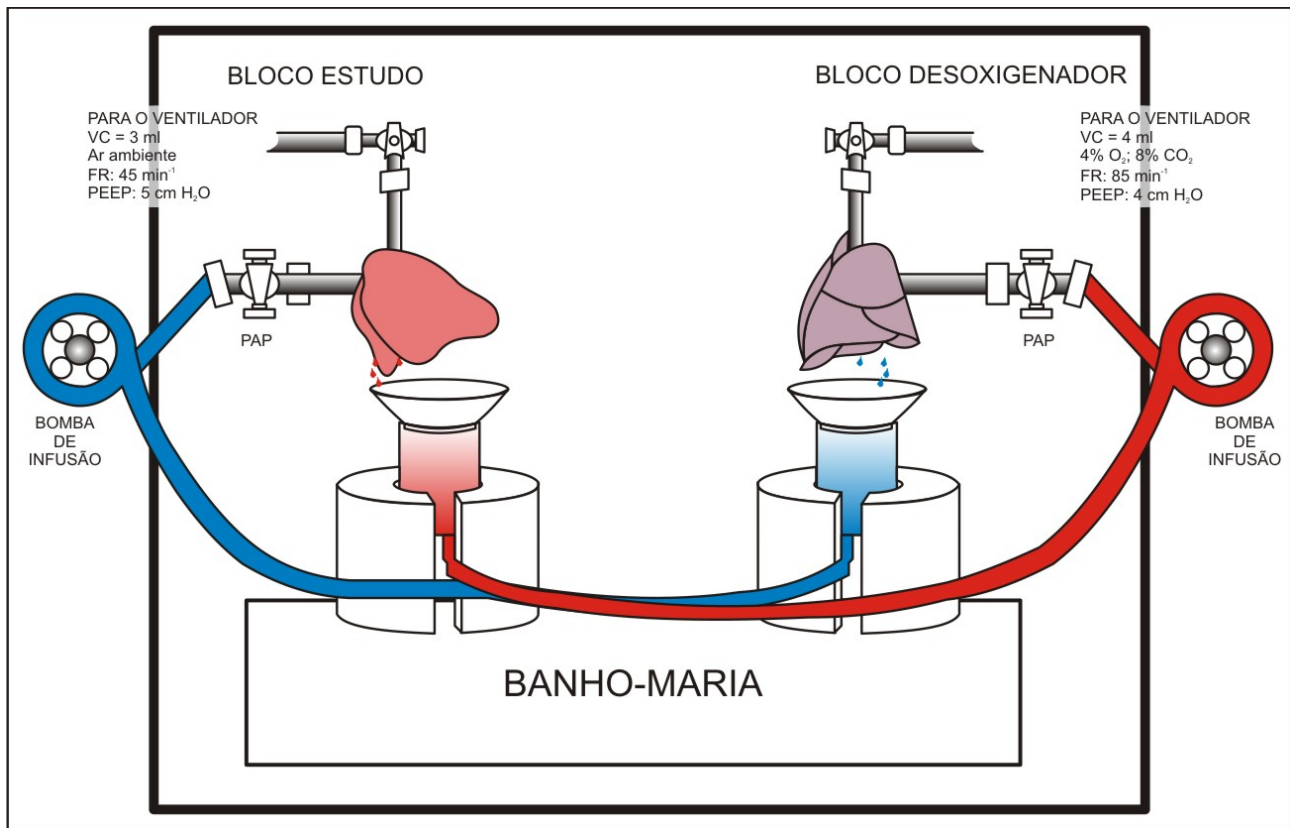


Figura 2: Modelo de reperfusão isolada *ex-vivo* pulmão-para-pulmão (P-P). Durante a reperfusão, o sangue efluente do bloco-estudo era continuamente desoxigenado pelo bloco-desoxigenador (ventilado com mistura gasosa hipóxica) que era usado como fonte produtora de sangue venoso. Este sistema permite a reperfusão pulmonar *ex-vivo* com sangue venoso e avaliação das trocas gasosas, da hemodinâmica e da mecânica ventilatória dos pulmões estudados sob condições controladas pelo investigador.

### 3.1.5 Estudo das Trocas Gasosas

As amostras sanguíneas utilizadas para análise gasométrica (gasômetro AVL modelo Compact 2, Alemanha) foram coletadas no AE e no reservatório dos blocos estudo e desoxigenador, imediatamente (considerado como tempo 0), 15, 30 e 60 minutos após o início da reperfusão e da ventilação dos pulmões. Além do estudo do pH arterial e venoso, das pressões parciais arterial e venosa de O<sub>2</sub> (PaO<sub>2</sub> e PvO<sub>2</sub>, respectivamente), de CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub> e PvCO<sub>2</sub>, respectivamente), das saturações arterial e venosa de O<sub>2</sub> (SaO<sub>2</sub> e S<sub>v</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente), também calculamos a fração de *shunt* intrapulmonar dos pulmões-estudo, utilizando a seguinte equação [47]:

$$\frac{\dot{Q}_s}{\dot{Q}_t} = \frac{(Cc'O_2 - CaO_2)}{(Cc'O_2 - C_{\bar{v}}O_2)} \times 100\% \quad (1)$$

onde  $\dot{Q}_s$  é o fluxo sanguíneo pela fração *shuntada* do débito cardíaco,  $\dot{Q}_t$  é o débito cardíaco,  $Cc'O_2$ ,  $CaO_2$  e  $C_{\bar{v}}O_2$  são os conteúdos capilar, arterial e venoso de oxigênio, respectivamente. A saturação de oxigênio do sangue capilar foi calculada baseada na fração inspirada de oxigênio (FiO<sub>2</sub>), PaCO<sub>2</sub> e ainda assumindo como 0,8 o valor do coeficiente respiratório. Ainda sim, para o cálculo da fração de *shunt*, assumimos que: (i) a qualquer instante do tempo, a taxa de fluxo sanguíneo de entrada nos pulmões-estudo era igual a da saída e (ii) a 37 °C e com pH entre 7,30 e 7,50, a curva de dissociação da hemoglobina de ratos é similar a dos humanos.

### 3.1.6 Medida das Propriedades Mecânicas

A avaliação da mecânica respiratória é feita por um processo onde se provocam certas perturbações no sistema respiratório (*inputs*), mede-se as respostas (*outputs*), e então tenta-se relacionar os *inputs* aos *outputs* em termos de modelo matemático que representa o sistema.

Podemos dividir esta avaliação em dois processos distintos: (i) determinação estrutural e (ii) estimação dos parâmetros. A determinação estrutural é o processo cuja estrutura do modelo é estabelecida. Usualmente, significa decidir quantos compartimentos o modelo terá e como estes serão arranjados. Este processo está intimamente relacionado ao fato de

determinar a forma matemática das equações do modelo. O processo seguinte, a estimação dos parâmetros, é muito mais direto e envolve avaliação numérica dos parâmetros do modelo, relacionando seu comportamento aos valores medidos. É importante ressaltar que o modelo utilizado depende criticamente dos *inputs* e de como os *outputs* podem ser medidos.

Nesta fase, para avaliar as propriedades mecânicas dos pulmões-estudo e desoxigenador, utilizamos o modelo mais simples que representa o sistema respiratório: o linear unicompartimental proposto por Otis [48]. Este modelo incorpora dois elementos: um compartimento de elastância (E) constante, servido por uma via de resistência (R) constante, e se baseia na fato de que as propriedades mecânicas do sistema são independentes do volume (V) e do fluxo aéreo ( $\dot{V}$ ), e que as forças inerciais são desprezíveis.

Do ponto de vista mecânico, para que haja deformação do sistema respiratório, isto é, para que ocorra variação no volume, é preciso que uma força motriz movimente o corpo de Voigt (um amortecedor de resistência R e uma mola de elastância E arranjadas em paralelo). Parte da energia será dissipada, pelo amortecedor, sob a forma de calor, enquanto que a mola armazenará energia potencial, responsável por retornar o sistema, após ter cessada a força que o deformou, ao seu ponto de equilíbrio. O modelo linear unicompartimental está representado pela figura 3.

O modelo linear unicompartimental pode ser representado, matematicamente, por uma equação diferencial de primeira ordem, a equação do movimento do sistema respiratório:

$$P(t) = R\dot{V}(t) + EV(t) \quad (2)$$

Se todos os elementos desta equação forem divididos por  $\dot{V}$ :

$$\frac{P(t)}{\dot{V}} = \frac{R\dot{V}(t)}{\dot{V}} + \frac{EV(t)}{\dot{V}} \quad (3)$$

teremos:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 \quad (4)$$

ou seja, o comportamento mecânico do sistema poderá ser representado por uma reta. Isto quer dizer que a qualquer instante  $t$  de um ciclo respiratório, a pressão na abertura da via

aérea ( $P_{ao}$ ) é igual à soma dos componentes elástico (EV), resistivo (RV) e de um componente pressórico  $\beta_0$ , que reflete a  $P_{ao}$ , se ambos componentes, elástico e resistivo, forem iguais a zero [49].

O método utilizado para a medida das propriedades mecânicas dos pulmões foi a técnica linear de ajuste pelos mínimos quadrados [50, 51]. Este método determina a linha reta que melhor se ajusta ao modelo como a que minimiza a soma dos quadrados da distância vertical dos pontos observados no diagrama de dispersão à linha ajustada. Esta forma de se medir as propriedades mecânicas do sistema respiratório não requer nenhum padrão ventilatório especial nem manobras de oclusão [49], podendo ser aplicado ciclo-a-ciclo, em qualquer modo ventilatório e com qualquer padrão de fluxo [52].

Nos mesmos instantes utilizados para coleta de sangue e análise gasométrica (imediatamente, 15, 30 e 60 minutos após o início da reperfusão e da ventilação dos pulmões), a fase inspiratória de dez ciclos respiratórios consecutivos foi utilizada para o cálculo e estimação dos parâmetros da mecânica pulmonar: elastância (E), resistência total (R) e PEEP total [53].

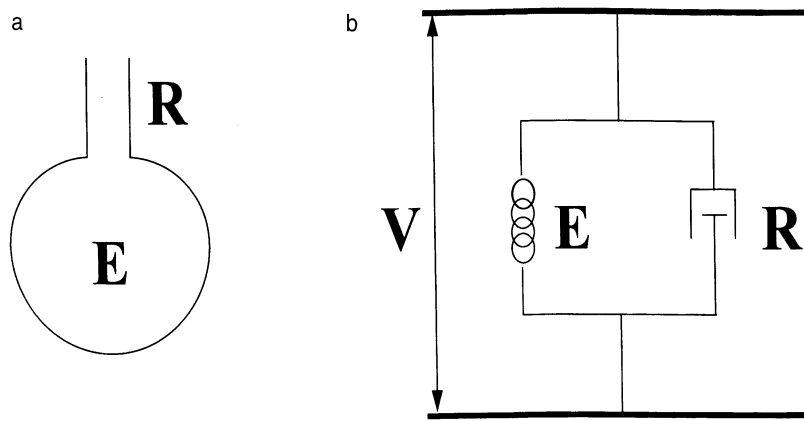


Figura 3: Modelo linear unicompartmental proposto por Otis. a) Representação anatômica: balão de elastância  $E$  servida por um tubo de resistência  $R$ . b) Representação mecânica composta por uma mola de elastância  $E$  e amortecedor com resistência Newtoniana  $R$ .  $V$  é o análogo do volume. Adaptado da referência [54].

### 3.1.7 Hemodinâmica Pulmonar

A medida da pressão da artéria pulmonar ( $P_{AP}$ ) foi realizada continuamente ao longo de todo período de reperfusão. A resistência vascular pulmonar foi obtida dividindo-se a  $P_{AP}$  pela vazão da bomba de infusão, visto que a pressão do átrio esquerdo era igual a zero. A pressão arterial pulmonar média ( $P_{\overline{AP}}$ ) foi calculada utilizando-se a média dos valores que a  $P_{AP}$  adquiriu durante 1 minuto nos instantes 0, 15, 30 e 60 minutos após o início da reperfusão [55].

### 3.1.8 Quantificação do Edema Pulmonar

Ao término de cada reperfusão e ao final da expiração, a traquéia de cada bloco era ocluída com fio de seda 3-0, o hilo pulmonar esquerdo ligado em bloco, o pulmão direito excisado, pesado em balança de precisão (balança analítica eletrônica 2104N, Bioprecisa), armazenado em estufa a 60 °C durante 72 horas e novamente pesados. A relação peso líquido/peso seco (PL/PS) era, então, calculada [56].

Dez animais adicionais foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos no item 3.1.3 mas não foram reperfundidos. Calculamos o PL/PS destes pulmões, seguindo a metodologia descrita nesta etapa e comparamos estes resultados aos dos pulmões-estudo e desoxigenador, com o intuito de saber se os pulmões reperfundidos no sistema P-P apresentariam, ao final do período de reperfusão, maior conteúdo de água do que aqueles que não foram submetidos à ventilação e nem à reperfusão *ex-vivo*.

### 3.1.9 Fixação dos Pulmões e Preparo das Lâminas

Ocluído na capacidade residual funcional (CRF), que nestas condições experimentais (pulmões isolados, *ex-vivo*) a CRF é consideravelmente menor do que a *in-vivo* pela ausência da caixa torácica, o pulmão esquerdo de cada bloco era congelado por imersão rápida em nitrogênio líquido, imediatamente colocado em solução de *Carnoy* (composta, em volume, por 60% de etanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético) a -70 °C durante 24 horas. Ao término deste período, a desidratação dos pulmões era realizada por aumento progressivo

das concentrações de etanol nas soluções, seguindo a seguinte rotina:

**MC-1:** 70% etanol, 22,5% clorofórmio e 7,5% ácido acético à -20 °C durante 1 hora;

**MC-2:** 80% etanol, 15% clorofórmio e 5% ácido acético à -20 °C durante 1 hora;

**MC-3:** 90% etanol, 7,5% clorofórmio e 2,5% ácido acético à -20 °C durante 1 hora;

Em etanol a 100%, os pulmões eram mantidos a -20 °C durante 4 horas, seguido de 12 horas a 4 °C e, por fim, em temperatura ambiente por 2 horas. Uma vez fixados, os tecidos pulmonares foram processados para cortes histológicos em parafina (3 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura) e corados com hematoxilina-eosina (HE) [57].

### 3.1.10 Análise Morfométrica

A análise morfométrica dos pulmões foi realizada, como previamente descrita por Gundersen [58], com um sistema teste coerente e de referência composto por 100 pontos e 50 linhas (comprimento conhecido) conectado à uma das oculares do microscópio óptico (Axioplan; Zeiss, Oberkochen, Alemanha). De cada lâmina, dez campos não coincidentes, escolhidos de forma aleatória, foram utilizados para a realização de tal análise. O aumento microscópico utilizado foi de 400x.

Pela técnica de contagem de pontos [58] foi contado o número de pontos do retículo que incidia em cada parâmetro analisado: número de pontos sobre: (i) áreas de colapso, (ii) áreas normais e (iii) áreas de hiperinsuflação (definida como as áreas que, no aumento de 400x, tinham diâmetro maior que 120  $\mu\text{m}$ ). As áreas normais, colapsadas e hiperinsufladas estão expressas sob a forma de porcentagem. Nenhum dado morfométrico relacionado à vasculatura pulmonar foi estudado porque não dispusemos de microscópio eletrônico.

### 3.1.11 Aquisição dos Sinais

Um pneumotacógrafo, construído segundo Mortola e Noworaj [59], ligado a um transdutor diferencial de pressão (PT5A, Grass, Quincy, MA, EUA) era conectado à saída de cada ventilador para registro e medida do fluxo aéreo ( $\dot{V}$ ) e, por integração eletrônica deste



sinal, calculávamos o volume (V). Proximalmente ao ventilador e antes do pneumotacógrafo, uma saída lateral estava conectada a um transdutor absoluto de pressão (P23 Db, Grass, Quincy, MA, EUA) para registro e medida da Pao.

Um transdutor absoluto de pressão (P23 Db, Grass, Quincy, MA, EUA) era conectado a uma das saídas das torneiras de três vias das cânulas arteriais pulmonares dos blocos-estudo e desoxigenador, o que permitia o registro e a medida da  $P_{AP}$ .

Todos os transdutores estavam ligados a um polígrafo (7C, Grass Instruments Co., Quincy, MA, EUA) onde os sinais eram filtrados e amplificados. Do polígrafo, os sinais seguiam para um módulo condicionador de sinais biológicos (EMG System do Brasil, São José dos Campos, São Paulo) e, então, para um conversor analógico-digital de 12 bits (EMG System do Brasil, São José dos Campos, São Paulo), com o intuito de transformar os sinais para o formato digital. Em um microcomputador, um para cada bloco, com uso do *software* Windaq/Pro (DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA), os sinais de  $\dot{V}$ , Pao e  $P_{AP}$  de todo o período de reperfusão eram registrados e armazenados para posterior análise. A frequência de amostragem utilizada foi de 200 Hz. A figura 4 mostra um exemplo do traçado dos sinais captados durante a reperfusão dos pulmões-estudo.

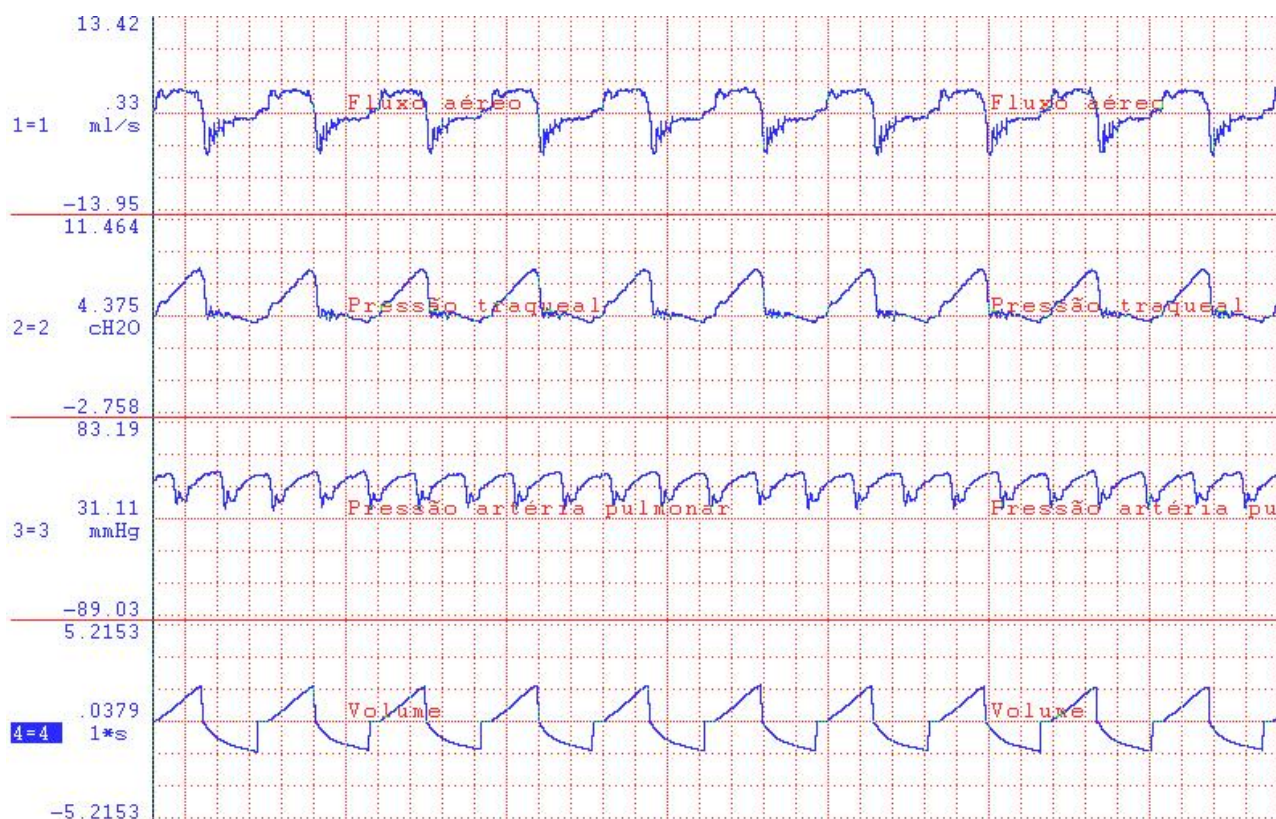


Figura 4: Exemplo de traçado dos sinais captados durante a reperfusão. De cima para baixo: sinais de fluxo aéreo, pressão traqueal e pressão da artéria pulmonar. O volume, último traçado, foi calculado pela integração eletrônica do sinal de fluxo. A frequência de amostragem utilizada foi de 200 Hz.

### 3.1.12 Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade da distribuição dos dados das variáveis gasométricas, hemodinâmicas, morfométricas, da mecânica pulmonar e do PL/PS dos blocos-estudo e desoxigenador. À exceção da porcentagem de área pulmonar hiperinsuflada, todas as demais variáveis estudadas apresentaram distribuição paramétrica.

O teste  $t$  para amostras independentes foi utilizado para comparar (i) os valores das variáveis gasométricas obtidas do sangue coletado no AE e no reservatório de cada bloco e (ii) a porcentagem de área pulmonar normal e colapsada obtidas pela análise morfométrica. A comparação dos valores da área pulmonar hiperinsuflada entre os pulmões dos blocos-estudo e desoxigenador foi feita pelo teste de Mann-Whitney.

Inicialmente, a análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas foi utilizada para testar a hipótese nula de que, durante os 60 minutos de reperfusão, não havia diferença entre:

1. os valores das variáveis gasométricas de AE dos blocos-estudo e desoxinegador;
2. os valores das variáveis gasométricas do reservatório dos blocos-estudo e desoxinegador;
3. os valores das variáveis mecânicas dos blocos-estudo e desoxinegador;
4. os valores das variáveis hemodinâmicas dos blocos-estudo e desoxinegador.

Quando no teste ANOVA com medidas repetidas, as variáveis dependentes não passavam pelo teste de esfericidade de Mauchly, o epsilon de Greenhouse-Geisser foi utilizado para análise da estatística  $F$  [60].

A ANOVA também foi utilizada para comparar os valores de PL/PS dos três grupos estudados, seguido do pós-teste de Tukey para comparação emparelhada dos grupos.

Todas as análises foram realizadas com o *software* SPSS versão 11.0.4 para Mac OSX. O nível de significância estabelecido para todas as análises foi de 5%.

## 3.2 Fase 2

### 3.2.1 Animais Utilizados

Para a realização dos experimentos desta fase foram utilizados 96 ratos machos, da raça Wistar, adquiridos no Laboratório BioAgri, Planaltina/DF, com peso entre 290 e 330 gramas.

### 3.2.2 Caracterização dos Grupos

Esta fase contém quatro grupos de estudo, um controle histórico e outros três formados pela divisão aleatória dos 96 ratos:

**Controle** Formado pelos pulmões minimamente lesados estudados na primeira fase deste projeto (controle histórico);

**Isquemia** Formado por 8 pulmões isolados que foram submetidos a *flush* vascular pulmonar (veja o item 3.2.3) com solução de preservação de Euro-Collins (composta por: 3,5 g.L<sup>-1</sup> de glicose; 57,5 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão-fosfato; 10 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão-bicarbonato; 10 mmol.L<sup>-1</sup> de sódio; 115 mmol.L<sup>-1</sup> de potássio; osmolaridade: 406), preservados por 10 horas a 4 °C (isquemia fria) e, após a preservação, foram reperfundidos rapidamente, isto é, o fluxo sanguíneo foi restabelecido abruptamente em seu valor máximo (12 mL.min<sup>-1</sup>). A solução de Euro-Collins foi utilizada neste projeto por (i) ser economicamente mais acessível que as demais e (ii) ainda ser amplamente utilizada na prática de transplantes de pulmão;

**CPT** Formado por 8 pulmões isolados que foram submetidos ao *flush* da circulação pulmonar com solução de preservação de Euro-Collins, preservados por 10 horas a 4 °C e, antes do início da reperfusão rápida, foram recrutados e mantidos na CPT durante dois minutos. Neste trabalho, a CPT foi definida como a pressão transpulmonar ( $P_{TP}$ ) = 30 cmH<sub>2</sub>O;

**VC** Formado por 8 pulmões isolados que foram submetidos a *flush* da circulação pulmonar com solução de preservação de Euro-Collins, preservados por 10 horas a 4 °C e, antes

do início da reperfusão rápida, ventilados com volume corrente de 3 mL durante dez minutos.

Em nenhum dos pulmões submetidos à insuflação à CPT ou à ventilação com volume corrente durante 10 minutos antes do início da reperfusão rápida, a torneira plástica de três vias foi aberta ao ar ambiente, ou seja, a Pao nunca retornou a zero, o que evitou o desrecrutamento pulmonar.

### 3.2.3 *Flush* Vascular Pulmonar

Nos animais doadores submetidos ao *flush* vascular pulmonar (FVP), a técnica utilizada para sedação, anestesia, traqueostomia, administração de heparina e introdução da cânula na artéria pulmonar foi semelhante à descrita no item 3.1.3. Entretanto, antes da extração dos blocos coração-pulmões, a circulação pulmonar destes recebia, com pressão hidrostática de 20 cmH<sub>2</sub>O, 50 mL.kg<sup>-1</sup> de *flush* [61] com solução de preservação de Euro-Collins a 4 °C.

Terminado o *flush*, os pulmões eram insuflados e mantidos em 50% da capacidade pulmonar total (CPT) [41]. Após a extração, os pulmões eram colocados em placa de Petri, previamente preenchida com solução de Euro-Collins, cobertos por filme plástico para evitar sua desidratação e mantidos por dez horas em isquemia fria a 4 °C.

Os blocos coração-pulmões utilizados como desoxigenadores foram excisados dez minutos antes do início de cada reperfusão, conforme a metodologia descrita no item 3.1.3.

### 3.2.4 Protocolo Experimental

Passadas as dez horas de isquemia fria, os pulmões do grupo Isquemia eram reperfundidos rapidamente (12 mL.min<sup>-1</sup>). Os do grupo CPT eram recrutados com P<sub>TP</sub> de 30 cmH<sub>2</sub>O e mantidos, com esta pressão, durante 2 minutos, antes de serem rapidamente reperfundidos. Para evitar seu desrecrutamento no período de transição entre a insuflação à CPT e o início da ventilação, o ramo expiratório do ventilador mecânico foi conectado e submerso 5 cm em um selo d'água. Os pulmões do grupo VC foram ventilados durante

dez minutos, com VC de 3 mL, FR de  $45.\text{min}^{-1}$  e PEEP de 5  $\text{cmH}_2\text{O}$  antes do início da reperfusão rápida. Os pulmões de todos os grupos eram ventilados e perfundidos por uma hora ou até que líquido de edema fosse observado no interior da cânula traqueal.

### **3.2.5 Avaliação das Trocas Gasosas, das Propriedades Mecânicas, da Hemodinâmica e da Relação Peso Líquido/Peso Seco dos Pulmões**

A avaliação das trocas gasosas assim como da hemodinâmica, das propriedades mecânicas pulmonares, do PL/PS e a aquisição dos sinais seguiram a mesma metodologia descrita na fase 3.1.

### **3.2.6 Análise Morfométrica**

Após o término do período de reperfusão, as traquéias dos blocos-estudo foram ocluídas na CRF e os pulmões preparados e fixados para análise morfométrica, como já descrito nos itens 3.1.9 e 3.1.10, respectivamente.

### **3.2.7 Análise Estatística**

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade da distribuição dos dados das variáveis gasométricas, hemodinâmicas, morfométricas, da mecânica pulmonar e do PL/PS do bloco-estudo dos quatro grupos.

A ANOVA foi utilizada para testar a hipótese nula de que não havia diferença significativa entre os quatro grupos estudados, dos valores:

1. das variáveis gasométricas do bloco-estudo, 0, 15, 30 e 60 minutos após o início da reperfusão;
2. das variáveis mecânicas do bloco-estudo 0, 15, 30 e 60 minutos após o início da reperfusão;
3. das variáveis hemodinâmicas do bloco-estudo 0, 15, 30 e 60 minutos após o início da reperfusão;

4. das percentagens de área alveolar normal e colapsada no bloco-estudo ao final da reperfusão.

Quando a hipótese nula era rejeitada, o pós-teste de Tukey foi utilizado para comparação emparelhada dos grupos.

A análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas foi utilizada para testar a hipótese nula de que, durante os 60 minutos de reperfusão, não havia diferença entre:

1. os valores das variáveis gasométricas do bloco-estudo de cada grupo estudado;
2. os valores das variáveis mecânicas do bloco-estudo de cada grupo estudado;
3. os valores das variáveis hemodinâmicas do bloco-estudo de cada grupo estudado.

Toda vez que, durante a ANOVA com medidas repetidas, as variáveis dependentes não passavam pelo teste de esfericidade de Mauchly, o epsilon de Greenhouse-Geisser foi utilizado para análise da estatística  $F$  [60].

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar: (i) os valores do PL/PS e (ii) o valor da área hiperinsuflada dos grupos estudados. Para comparação emparelhada, utilizamos o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas com o *software* SPSS versão 11.0.4 para Mac OSX. O nível de significância estabelecido, para todas as análises, foi de 5%.

### 3.3 Fase 3

#### 3.3.1 Animais Utilizados

Para a realização dos experimentos desta fase, foram utilizados 40 ratos machos, da raça Wistar, adquiridos no Laboratório BioAgri, Planaltina/DF, com peso entre 300 e 325 gramas.

### 3.3.2 Caracterização dos Grupos

Os 40 animais foram divididos, aleatoriamente, em cinco grupos, assim caracterizados:

**Controle** Formado por 8 pulmões isolados submetidos somente a 15-20 minutos de isquemia em ar ambiente, não submetidos ao FVP e nem à isquemia fria. Pulmões controle, lesão mínima;

**Flush** Formado por 8 pulmões isolados submetidos ao FVP com solução de preservação Euro-Collins, mas não à isquemia fria; estes pulmões foram submetidos a 15-20 minutos de isquemia em ar ambiente;

**Isquemia** Formado por 8 pulmões isolados submetidos ao FVP com solução de preservação Euro-Collins e preservados por 10 horas a 4 °C (isquemia fria);

**CPT** Formado por 8 pulmões isolados submetidos ao FVP com solução de preservação Euro-Collins, preservados por 10 horas a 4 °C e recrutados à capacidade pulmonar total (CPT), definida como  $P_{TP}$  de 30 cmH<sub>2</sub>O, por 2 minutos;

**VC** Formado por 8 pulmões isolados submetidos ao FVP com solução de preservação Euro-Collins, preservados por 10 horas a 4 °C e ventilados com VC de 3 mL e FR de 45.min<sup>-1</sup> e PEEP de 5 cmH<sub>2</sub>O durante 10 minutos.

### 3.3.3 Técnica de Extração dos Blocos Coração-Pulmões

A extração dos blocos coração-pulmões, nesta fase, seguiu o mesmo protocolo descrito na seção 3.1.3, e o *flush* vascular pulmonar com solução de preservação foi realizado como anteriormente descrito na seção 3.2.3.

### 3.3.4 Medidas das Propriedades Mecânicas

Nesta fase, para as medidas das propriedades mecânicas dos pulmões, utilizamos um modelo mecânico mais complexo do que o utilizado nas fases 1 e 2. Isto porque o



modelo unicompartimental proposto por Otis [48], apesar de bastante simples, não explica alguns fenômenos como (i) a queda lenta da pressão observada após rápida e sustentada oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, (ii) a frequência-dependência da elastância e da resistência e (iii) a histerese da curva pressão-volume quasi-estática observada em pulmões isolados [54]. Este método de medida não foi realizado nas duas primeiras fases deste projeto para avaliar as propriedades mecânicas dos pulmões-estudo porque o ventilador mecânico utilizado para ventilar tais pulmões não possuía nenhum dispositivo que ocluisse rapidamente (tempo de fechamento das vias aéreas menor que 10 ms) as vias aéreas ao final da inspiração.

Desta forma, o modelo mecânico utilizado para estas medidas, nesta fase, foi o reológico, bicompartimental viscoelástico proposto por Bates [62], baseado nos estudos de Mount [63] e Sharp [64]. A figura 5 ilustra o modelo bicompartimental viscoelástico. Este modelo é composto por dois componentes arranjados em paralelo: um amortecedor ( $R_1$ ) que representa a resistência das vias aéreas, e um corpo de Kelvin. O corpo de Kelvin é composto por uma mola ( $E_1$ ), que representa a elastância estática do sistema, em paralelo a um corpo de Maxwell: amortecedor ( $R_2$ ) conectado em série à mola ( $E_2$ ).  $R_2$  e  $E_2$  representam o componente viscoelástico do sistema respiratório. A distância entre as barras representa o volume e a velocidade com que elas se afastam, o fluxo. A constante de tempo do corpo de Maxwell,  $\tau_2$ , se dá pela razão de  $R_2$  por  $E_2$ .

Se uma força motriz deforma o sistema, e as barras, a partir do ponto de equilíbrio elástico, se afastam a uma determinada velocidade, os pontos de ligação do amortecedor  $R_1$  e das molas  $E_1$  e  $E_2$  se movem com a mesma velocidade ( $\dot{V}$ ). Cada ponto desse corresponde a uma pressão: fluxo-resistiva, elástica e viscoelástica, respectivamente. A somatória de todas estas pressões corresponde à pressão total de distensão do sistema.

Quando o fluxo aéreo é abruptamente interrompido por oclusão rápida da válvula inspiratória do ventilador mecânico, e esta oclusão se mantém por um longo período de tempo (5 s), as barras do modelo permanecem com a mesma distância, visto que o volume insuflado é armazenado nos pulmões. O amortecedor  $R_1$  completa seu trabalho no instante  $t = T_i$  e a pressão relacionada a ela cai a zero. A mola  $E_1$  é bloqueada entre as barras e continua a exercer sua força elástica no sentido oposto à sua deformação ( $Est.V(t)$ ). A mola  $E_2$  pára no

seu comprimento de equilíbrio enquanto que o amortecedor  $R_2$  continua se movimentando até que  $5 \tau_2$  seja alcançada. Após a abertura das vias aéreas, o modelo retorna ao seu ponto de equilíbrio.

A medida das propriedades mecânicas dos pulmões estudados nos cinco grupos foi avaliada pelo método de oclusão rápida das vias aéreas ao final da inspiração, proposto por Bates e cols [65].

Os pulmões eram ventilados com ar ambiente,  $\dot{V}$  e  $V$  constantes ( $10 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$  e  $2 \text{ mL}$ , respectivamente) e PEEP de  $5 \text{ cmH}_2\text{O}$  (Samay VR 15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay). Ao final da inspiração, as vias aéreas eram ocluídas por 6 segundos, seguida de expiração livre. Após a oclusão das vias aéreas, há queda rápida da pressão ( $\Delta P_1$ ) de um ponto máximo ( $P_{\text{máx}}$ ) até um ponto de inflexão ( $P_i$ ), seguida de queda lenta ( $\Delta P_2$ ) até que um platô pressórico seja atingido. A queda rápida reflete a pressão necessária para vencer as resistências newtonianas das vias aéreas e do pulmão, a lenta representa a dissipação pressórica nos componentes viscoelásticos e inhomogeneidades dos tecidos pulmonares e o platô corresponde à pressão de retração elástica pulmonar ( $P_{el}$ ). As elastâncias estática ( $Est$ ) e dinâmica ( $Edyn$ ) foram obtidas pela divisão da  $P_{el} - PEEP$  e do  $P_i - PEEP$  pelo volume corrente, respectivamente, e resistência das vias aéreas, dividindo-se  $\Delta P_1$  pelo  $\dot{V}$  gerado pelo ventilador imediatamente antes da oclusão das vias aéreas. Os valores de resistência das vias aéreas apresentados nos resultados são puramente pulmonares, visto que a resistência do equipamento ( $R_{eq}$ , igual a  $0,03 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{s}$ ) foi subtraída da resistência total do sistema. Os traçados da  $P_{ao}$ ,  $\dot{V}$  e  $V$  durante uma oclusão das vias aéreas ao final da inspiração estão ilustradas na figura 6.

### 3.3.5 Análise Morfométrica

Após o término do período de reperfusão, as traquéias dos blocos-estudo foram ocluídas na CRF e os pulmões preparados e fixados para análise morfométrica, como descrito, anteriormente, nos itens 3.1.9 e 3.1.10, respectivamente.

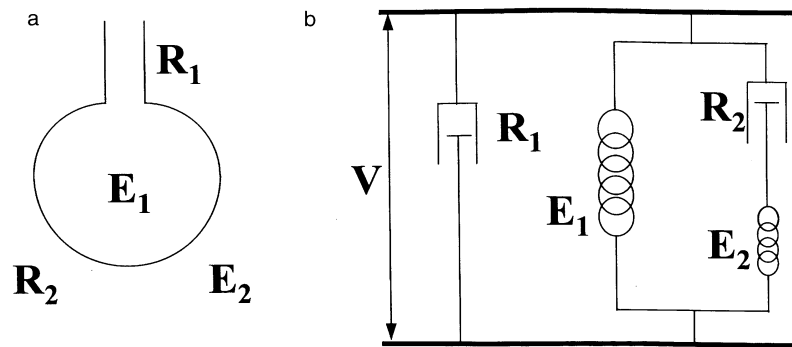


Figura 5: Modelo linear bicompartimental proposto por Mount. a) Representação anatômica. b) Representação mecânica composta por um amortecedor  $R_1$  ligado em paralelo a uma mola de elastância  $E_1$  associados em paralelo a um corpo de Maxwell (amortecedor  $R_2$  ligado em série a uma mola  $E_2$ ).  $V$  representa o volume. Adaptado da referência [54].



Figura 6: De cima para baixo: sinais de fluxo aéreo, pressão traqueal e volume administrados durante ventilação mecânica com manobra de oclusão das vias aéreas ao final da inspiração. O volume foi obtido por integração eletrônica do sinal de fluxo. A frequência de amostragem utilizada foi de 200 Hz.

### 3.3.6 Aquisição dos Sinais

Um pneumotacógrafo, construído segundo Mortola e Noworaj [59], ligado a um transdutor diferencial de pressão (PT5A, Grass, Quincy, MA, EUA) era conectado à saída de cada ventilador para registro e medida do  $\dot{V}$ , e por integração eletrônica deste sinal, calculávamos o  $V$ . Proximalmente ao ventilador e antes do pneumotacógrafo, uma saída lateral estava conectada a um transdutor absoluto de pressão (P23 Db, Grass, Quincy, MA, EUA) para registro e medida da  $P_{ao}$ .

Todos os transdutores estavam ligados a um polígrafo (7C, Grass Instruments Co., Quincy, MA, EUA) onde os sinais eram filtrados e amplificados. Do polígrafo, os sinais seguiam para um módulo condicionador de sinais biológicos (EMG System do Brasil, São José dos Campos, São Paulo) e, então, para um conversor analógico-digital de 12 bits (EMG System do Brasil, São José dos Campos, São Paulo) com o intuito de transformar os sinais para o formato digital. Em um microcomputador, com uso do *software* Windaq/Pro (DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA), os sinais de  $\dot{V}$  e  $P_{ao}$  eram registrados e armazenados para posterior análise. A frequência de amostragem utilizada foi de 200 Hz.

### 3.3.7 Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade da distribuição dos dados das variáveis mecânicas pulmonares dos pulmões dos cinco grupos estudados. A ANOVA foi utilizada para comparar cada variável mecânica entre os grupos estudados, e o pós-teste de Tukey foi utilizado para comparação emparelhada dos grupos quando, pela ANOVA, a hipótese nula era rejeitada [60].

As variáveis  $\Delta P_1$ ,  $\Delta P_2$ ,  $E_{dyn}$ ,  $Est$  e  $R_{nit}$  foram consideradas como independentes, e "edema pulmonar", como variável dependente para a montagem de um modelo de regressão logística. O método escolhido para a entrada das variáveis dependentes foi o *Forward Stepwise*, a probabilidade de entrada da variável foi menor que 0,05 e a de saída maior que 0,10. Todas as análises foram realizadas com o *software* SPSS versão 11.0.4 para Mac OSX. O nível de significância estabelecido para todas as análises foi de 5%.

## 4 Resultados

### 4.1 Fase 1

#### 4.1.1 Estudo das Trocas Gasosas

As trocas gasosas dos pulmões-estudo (controle negativo, não submetidos ao FVP ou à isquemia fria) se mantiveram estáveis e, como esperado, dentro da faixa de normalidade, não havendo diferença significativa nos valores de pH, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> e SaO<sub>2</sub> durante o período de reperfusão. Estes valores estão mostrados na tabela 3.

Como demonstrado na tabela 4, a composição do sangue venoso (pH, PvO<sub>2</sub>, PvCO<sub>2</sub> e S<sub>v</sub>O<sub>2</sub>) manteve-se estável durante o período de reperfusão. Ao longo dos 60 minutos, não houve diferença significativa em nenhuma das variáveis gasométricas, como também não houve diferença entre a composição gasosa do sangue coletado no AE e no reservatório. Esta comparação foi realizada para avaliar um possível efeito do contato com o ar ambiente na composição gasosa do sangue do reservatório.

Tabela 3: Bloco-estudo: pH, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub> e fração de *shunt* do átrio esquerdo e do reservatório durante os 60 minutos de reperfusão

Variáveis	Local	0 min	15 min	30 min	60 min
pH	Átrio Esquerdo	7,39	7,38	7,39	7,38
	Reservatório	7,41	7,40	7,40	7,40
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	Átrio Esquerdo	90,97 ± 4,51	90,12 ± 4,18	90,05 ± 4,69	90,28 ± 3,18
	Reservatório	88 ± 3,49	88,15 ± 4,57	86,32 ± 4,34	87,21 ± 4,57
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	Átrio Esquerdo	40,49 ± 4,89	40,21 ± 4,78	39,72 ± 5,55	39,11 ± 3,78
	Reservatório	38,48 ± 6,41	38,78 ± 5,68	37,30 ± 5,36	37,05 ± 3,68
SaO <sub>2</sub> (%)	Átrio Esquerdo	91,51 ± 6,47	91,36 ± 6,58	92,36 ± 5,68	91,52 ± 6,81
	Reservatório	88,56 ± 6,07	90,48 ± 6,07	91,48 ± 6,76	91,89 ± 6,07
<i>shunt</i> (%)	Pulmão-estudo	1,83 ± 0,49	1,83 ± 0,32	1,86 ± 0,39	1,91 ± 0,42

Os valores representam a média ± desvio-padrão dos blocos estudados durante os 60 minutos de reperfusão para as variáveis PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> e SaO<sub>2</sub>; para o pH, o valor apresentado é o de média geométrica. pH = potencial hidrogeniônico; PaO<sub>2</sub> = pressão parcial arterial de oxigênio; PaCO<sub>2</sub> = pressão parcial arterial de gás carbônico; SaO<sub>2</sub> = saturação arterial de oxigênio.

Tabela 4: Bloco-desoxigenador: pH, PvO<sub>2</sub>, PvCO<sub>2</sub> e S<sub>v</sub>O<sub>2</sub> do átrio esquerdo e do reservatório durante os 60 minutos de reperfusão

Variáveis	Local	0 min	15 min	30 min	60 min
pH	Átrio Esquerdo	7,37	7,38	7,38	7,38
	Reservatório	7,37	7,39	7,40	7,41
PvO <sub>2</sub> (mmHg)	Átrio Esquerdo	41,56 ± 3,23	42,35 ± 3,77	43,06 ± 2,83	41,06 ± 3,70
	Reservatório	42,23 ± 3,52	41,32 ± 3,51	42,83 ± 4,92	40,02 ± 4,17
PvCO <sub>2</sub> (mmHg)	Átrio Esquerdo	46,86 ± 3,73	45,22 ± 3,25	46,48 ± 5,17	45,10 ± 8,43
	Reservatório	47,06 ± 5,15	44,25 ± 4,54	44,54 ± 5,47	44,57 ± 6,34
S <sub>v</sub> O <sub>2</sub> (%)	Átrio Esquerdo	73,94 ± 3,14	72,01 ± 4,21	71,33 ± 5,99	71,01 ± 5,64
	Reservatório	73,22 ± 3,56	72,33 ± 4,64	71,62 ± 4,26	70,82 ± 4,30

Os valores representam a média ± desvio-padrão dos blocos estudados durante os 60 minutos de reperfusão para as variáveis PvO<sub>2</sub>, PvCO<sub>2</sub> e SvO<sub>2</sub>; para o pH, o valor apresentado é o de média geométrica. pH = potencial hidrogeniônico; PvO<sub>2</sub> = pressão parcial venosa de oxigênio; PvCO<sub>2</sub> = pressão parcial venosa de gás carbônico; S<sub>v</sub>O<sub>2</sub> = saturação venosa de oxigênio.

#### 4.1.2 Propriedades Mecânicas

Do ponto de vista mecânico, os componentes elástico e resistivo dos pulmões-estudo e desoxigenador utilizados no modelo de circulação pulmonar P-P se mantiveram estáveis durante os 60 minutos de reperfusão. A elastância dos pulmões-estudo se manteve em torno de 1,2 cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>, enquanto que a dos desoxigenadores ficou próximo de 2,0 cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup> (figura 7). A resistência total dos pulmões-estudo e dos desoxigenadores também não se

alteraram durante o período de reperfusão (figura 8).

#### 4.1.3 Hemodinâmica Pulmonar

A figuras 9 e 10 mostram, respectivamente, o comportamento da pressão média da artéria pulmonar ( $P_{AP}$ ) e da resistência vascular pulmonar (RVP) ao longo dos 60 minutos de reperfusão dos pulmões-estudo e dos desoxinegadores. A  $P_{AP}$  dos dois blocos tende a diminuir nos primeiros 15 minutos de reperfusão e, a partir daí, se estabiliza. O mesmo comportamento é observado na RVP dos dois blocos.

Como os pulmões desoxinegadores foram ventilados com mistura gasosa hipóxica e, portanto, submetidos à baixa pressão alveolar de oxigênio ( $P_{AO_2}$ ), a  $P_{AP}$  e também foram ventilados com maior volume corrente, e a RVP destes blocos foram ligeiramente mais altas que a do estudo (que foram ventilados com ar ambiente), embora esta diferença não tenha sido significativamente diferente. Também não houve diferença, ao longo do tempo, de  $P_{AP}$  e RVP para cada bloco estudado.

#### 4.1.4 Relação Peso líquido/Peso seco

A figura 11 apresenta a relação PL/PS dos três grupos estudados (controle, estudo e desoxigenador). Como anteriormente descrito, os pulmões controle não foram submetidos à reperfusão, mas tão somente extraídos dos doadores e pesados. A relação PL/PS foi similar nos três grupos, em torno de 4,5 como demonstra a figura (a diferença encontrada não foi significativa).

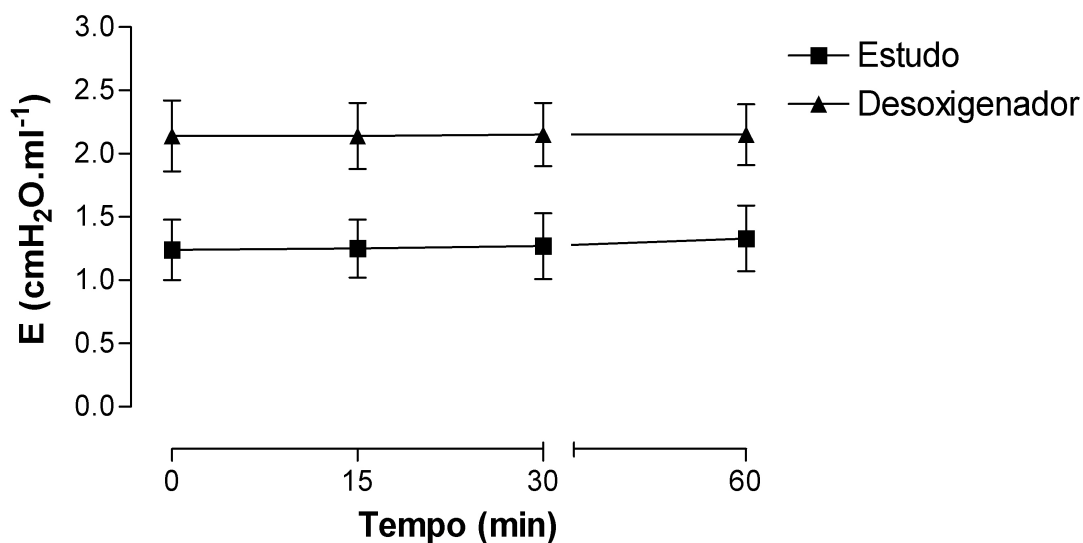


Figura 7: Elastância dos pulmões-estudo e desoxigenadores imediatamente, 15, 30 e 60 minutos após o início da reperfusão. Os valores representam a média  $\pm$  desvio-padrão de 8 blocos estudados em cada grupo.

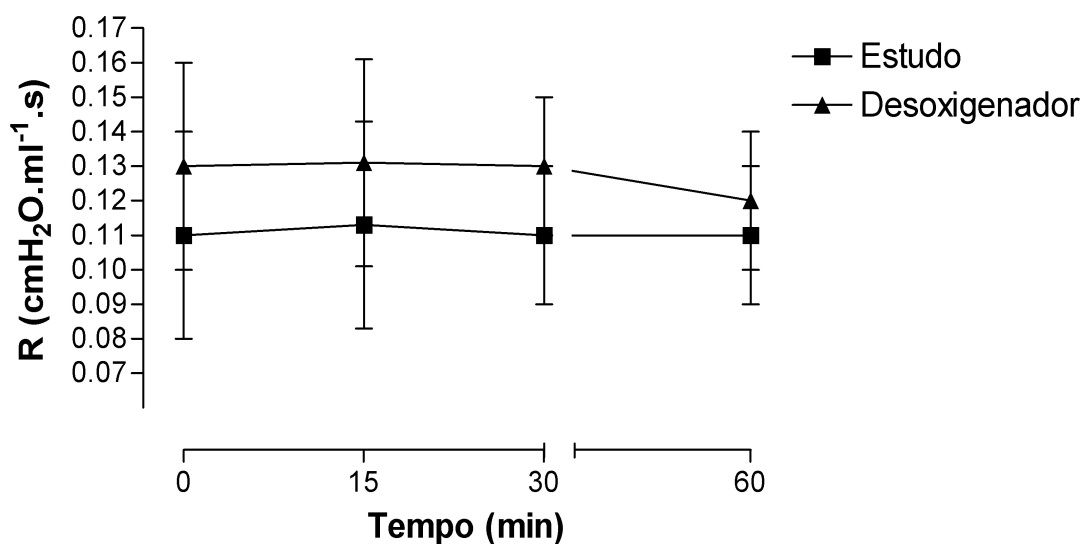


Figura 8: Resistência dos pulmões-estudo e desoxigenadores imediatamente, 15, 30 e 60 minutos após o início da reperfusão. Os valores representam a média  $\pm$  desvio-padrão de 8 blocos estudados em cada grupo.



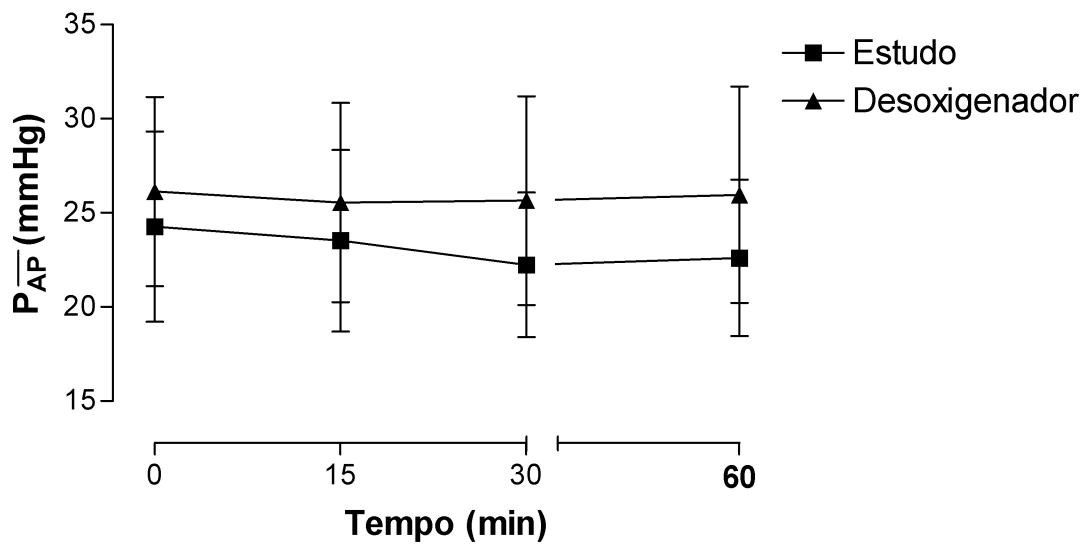


Figura 9: Pressão média da artéria pulmonar dos pulmões-estudo e desoxigenadores imediatamente, 15, 30 e 60 minutos após o início da reperfusão. Os valores representam a média  $\pm$  desvio-padrão de 8 blocos estudados em cada grupo.

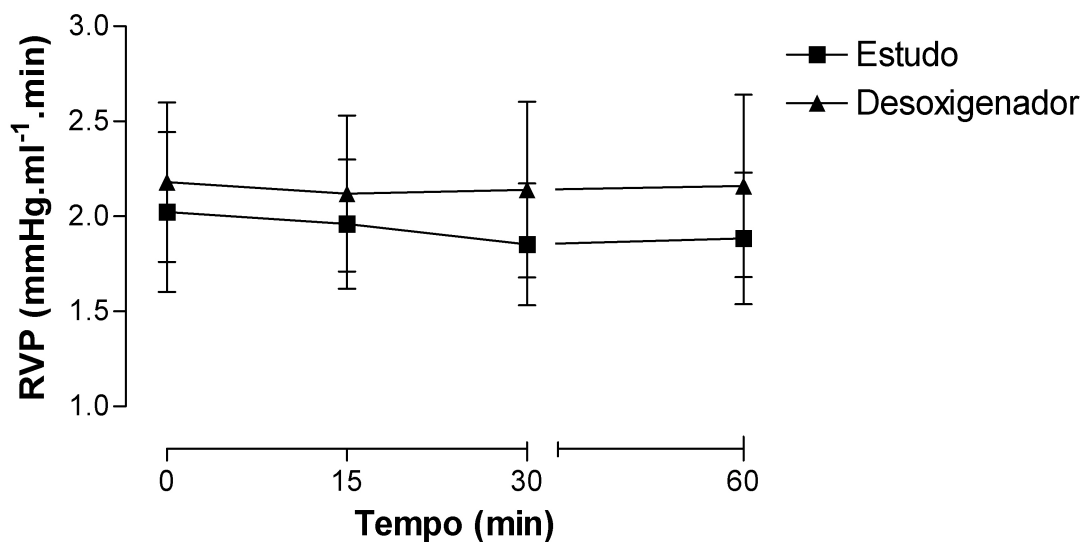


Figura 10: Resistência vascular pulmonar dos pulmões-estudo e desoxigenadores imediatamente, 15, 30 e 60 minutos após o início da reperfusão. Os valores representam a média  $\pm$  desvio-padrão de 8 blocos estudados em cada grupo.

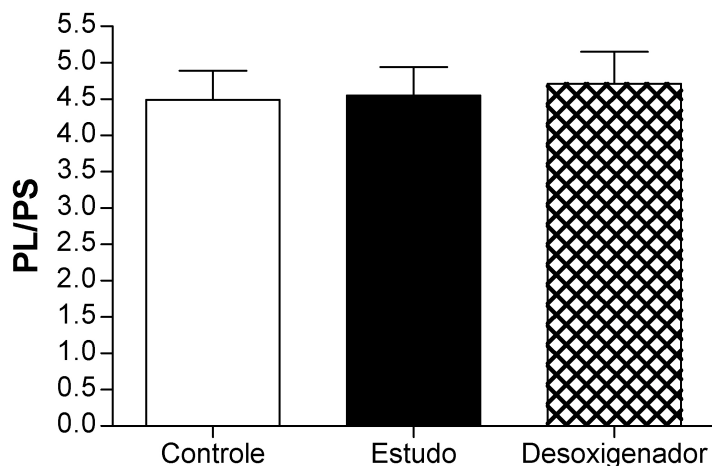


Figura 11: Relação peso líquido/seco (PL/PS) dos pulmões controle, estudo e desoxigenadores. As barras representam a média + desvio-padrão de 10 pulmões estudados no grupo controle e de 8 pulmões estudados nos grupos estudo e desoxigenador. Os pulmões do grupo controle não foram submetidos à reperfusão *ex-vivo*.

#### 4.1.5 Análise Morfométrica

A análise morfométrica dos pulmões estudo e desoxigenador mostrou que aproximadamente 85% da área pulmonar era composta por alvéolos de tamanho normal, 14,5% por alvéolos colapsados e 0,5% por hiperinsuflados. Não houve diferença significativa entre a porcentagem de área normal, colapsada e hiperinsuflada entre os pulmões-estudo e desoxigenador. O gráfico 12 mostra a distribuição percentual das áreas normal, colapsada e hiperinsuflada, e as figuras 13 e 14, a fotomicrografia dos pulmões estudados.

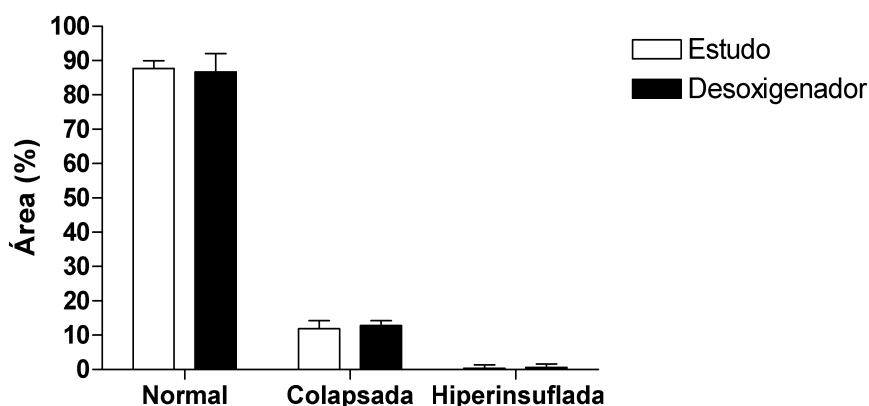


Figura 12: Porcentagem das áreas normal, colapsada e hiperinsufladas dos pulmões-estudo e desoxigenador. As barras representam a média + desvio-padrão de 8 blocos estudados em cada grupo.

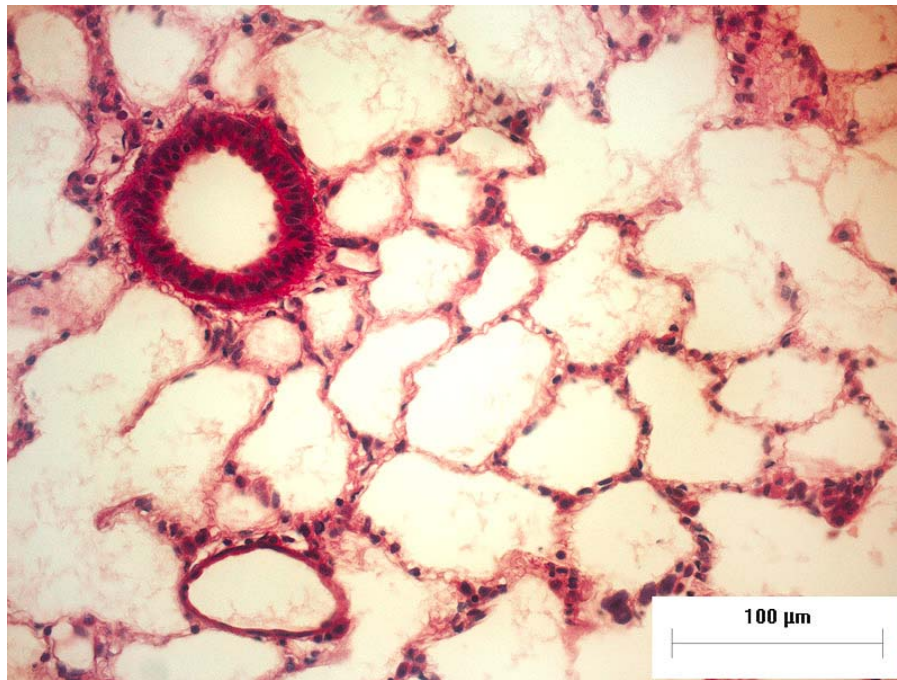


Figura 13: Parênquima pulmonar representativo do pulmão-estudo após 60 minutos de reperfusão no sistema pulmão-para-pulmão (hematoxilina-eosina; aumento 400x). Na fotomicrografia evidencia-se uniformidade na distribuição de ar inspirado: tecido de aspecto normal, poucas áreas de colapso e de hiperinsuflação.

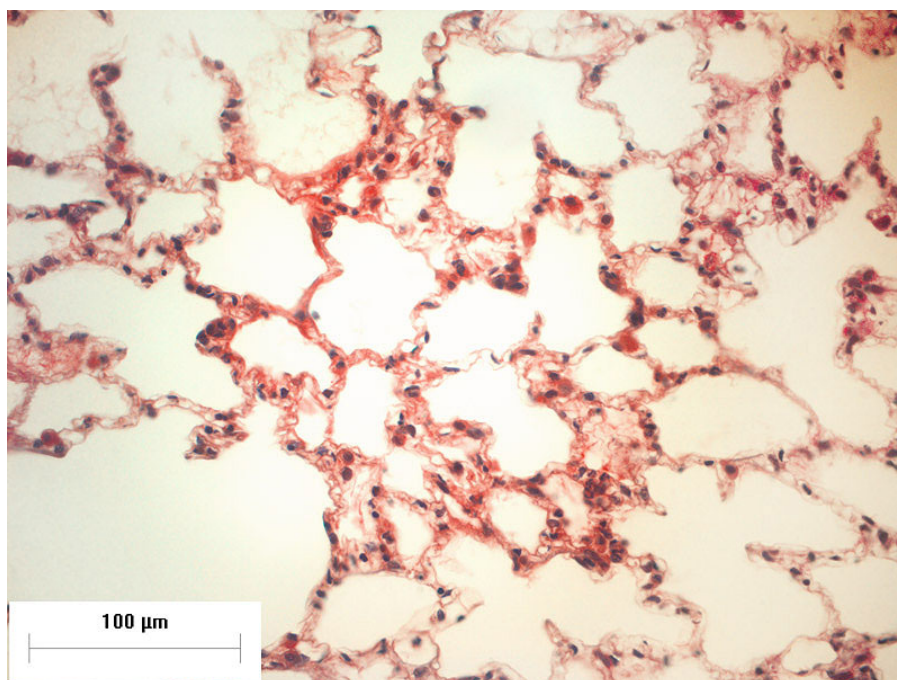


Figura 14: Parênquima pulmonar representativo do pulmão-desoxinegador (hematoxilina-eosina; aumento 400x). Na fotomicrografia evidencia-se uniformidade na distribuição de ar inspirado: tecido de aspecto normal, poucas áreas de colapso e de hiperinsuflação.

## 4.2 Fase 2

Na primeira fase deste projeto demonstramos o funcionamento e a estabilidade do modelo de circulação pulmonar P-P *ex-vivo* desenvolvido por DeCampos [45] adaptado às circunstâncias logísticas da UnB. Tanto o pulmão-estudo quanto o desoxigenador mantiveram, ao longo dos 60 minutos de reperfusão, suas funções mecânicas, hemodinâmicas e de trocas gasosas estáveis e dentro dos limites de normalidade.

Como não houve diferença significativa na composição gasosa do sangue coletado no AE e nos reservatórios (item 4.1.1 da fase 1 deste experimento), nesta segunda fase, o estudo das trocas gasosas e da  $\dot{V}_A$  dos pulmões-estudo e desoxigenadores foi feito somente pela análise do sangue coletado no AE.

À exceção das variáveis gasométricas, os dados das propriedades mecânicas, da hemodinâmica, do PL/PS e da análise morfométrica dos pulmões-desoxigenadores foram suprimidos porque, como já demonstrado na fase 1, houve estabilidade de todas estas funções durante o período de reperfusão.

### 4.2.1 Estudo das Trocas Gasosas

A tabela 5 apresenta os valores médios de pH, PvO<sub>2</sub>, PvCO<sub>2</sub> e S<sub>v</sub>O<sub>2</sub> dos blocos desoxigenadores nos quatro grupos estudados durante o período de reperfusão. Estes dados demonstram que a composição gasosa do sangue venoso manteve-se estável durante todo experimento nos quatro grupos. Não houve modificação significativa nestas variáveis durante o período de reperfusão em nenhum dos quatro grupos estudados (comparação intragrupo). Da mesma maneira, num dado momento da reperfusão, a comparação intergrupos, demonstrou uma composição gasosa similar em todos eles. Os pulmões minimamente lesados, os insuflados à CPT e os ventilados por 10 minutos antes do restabelecimento do fluxo sanguíneo completaram os 60 minutos de reperfusão, enquanto que os que foram submetidos ao FVP e à isquemia fria, mas não foram recrutados antes da reperfusão, desenvolveram edema fulminante durante os primeiros 15 minutos, com surgimento de líquido de edema na cânula traqueal. Neste momento, a reperfusão foi interrompida.

A figura 15 apresenta a  $PaO_2$ , ao longo do período de reperfusão, nos quatro grupos estudados. A  $PaO_2$  dos pulmões submetidos ao *flush* e à isquemia mas não ao recrutamento alveolar antes do início da reperfusão foi significativamente menor que as dos demais ( $p=0,0001$ ). Nos pulmões insuflados à CPT e nos submetidos à ventilação com volume corrente por 10 minutos antes do início da reperfusão ter sido reiniciada, os valores de  $PaO_2$  mantiveram-se estáveis ao longo do tempo, mas foram significativamente menores que os do grupo minimamente lesado ( $p=0,001$ ). Durante todo período de reperfusão, a  $PaO_2$  do pulmões submetidos à ventilação com volume corrente por 10 minutos antes da reperfusão foi significativamente menor que a dos insuflados à CPT ( $p=0,001$ ).

A fração de *shunt* dos pulmões submetidos ao *flush* e à isquemia e que não foram tratados com nenhuma estratégia ventilatória específica foi significativamente maior que a dos outros grupos ( $p=0,0001$ ). Nos pulmões insuflados à CPT e nos ventilados com volume corrente antes da reperfusão, a fração de *shunt* se manteve estável durante os 60 minutos de reperfusão e foi similar a dos pulmões minimamente lesados. Figura 16.

Tabela 5: Bloco-desoxigenador: pH,  $PvO_2$ ,  $PvCO_2$  e  $S_{\bar{v}}O_2$  durante os 60 minutos de reperfusão

Variáveis	Grupo	0 min	15 min	30 min	60 min
pH	Controle	7,37	7,38	7,38	7,38
	Isquemia	7,37	7,38		
	CPT	7,43	7,40	7,42	7,43
	VC	7,37	7,38	7,37	7,37
$PvO_2$ (mmHg)	Controle	41,56 ± 3,23	42,45 ± 3,23	43,06 ± 2,83	41,08 ± 3,7
	Isquemia	41,20 ± 3,55	41,96 ± 2,71		
	CPT	43,45 ± 2,96	42,07 ± 3,19	43,05 ± 3,05	43,9 ± 3,92
	VC	41,21 ± 2,14	42,86 ± 2,28	42,93 ± 2,23	43,11 ± 2,88
$PvCO_2$ (mmHg)	Controle	46,86 ± 3,73	45,22 ± 3,25	46,48 ± 5,17	45,10 ± 8,43
	Isquemia	47,78 ± 3,40	47,23 ± 3,18		
	CPT	46,65 ± 2,55	45,38 ± 3,64	43,32 ± 4,46	44,52 ± 3,96
	VC	46,25 ± 2,90	45,11 ± 2,17	44,23 ± 3,11	46,8 ± 3,56
$S_{\bar{v}}O_2$ (%)	Controle	73,94 ± 3,14	72,01 ± 4,21	71,33 ± 5,99	71,01 ± 5,64
	Isquemia	70,08 ± 3,29	72,25 ± 3,13		
	CPT	73,30 ± 2,76	73,05 ± 3,64	73,17 ± 3,60	72,04 ± 3,02
	VC	73,25 ± 3,72	74,68 ± 2,71	73,53 ± 3,90	72,46 ± 3,35

Os valores representam a média ± desvio-padrão das variáveis gasométricas dos quatro grupos estudados durante os 60 minutos de reperfusão; para o pH, o valor apresentado é de média geométrica. pH = potencial hidrogeniônico;  $PvO_2$  = pressão parcial venosa de oxigênio;  $PvCO_2$  = pressão parcial venosa de gás carbônico;  $S_{\bar{v}}O_2$  = saturação venosa de oxigênio. Os valores mostrados nesta tabela foram obtidos pela análise gasométrica do sangue coletado no átrio esquerdo. Todos os grupos  $n = 8$ .

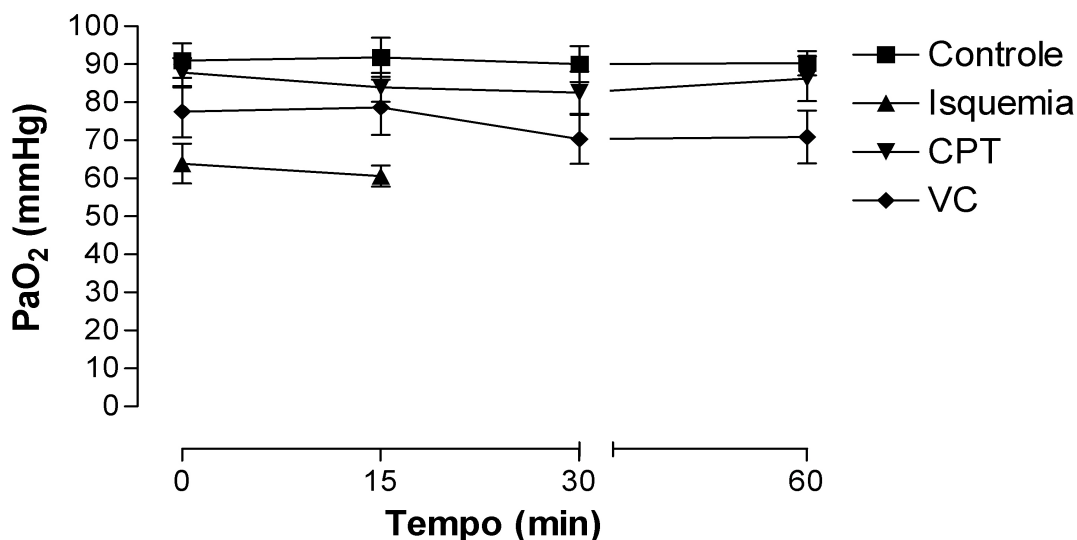


Figura 15: Pressão parcial arterial de oxigênio durante os 60 minutos de reperfusão dos quatro grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos antes do início da reperfusão; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos antes do início da reperfusão. Os valores representam média  $\pm$  desvio-padrão de 8 blocos para cada grupo. No grupo que não foi submetido a manobras de recrutamentos pré-reperfusão (isquemia), o procedimento foi interrompido após 15 minutos devido a edema pulmonar fulminante.

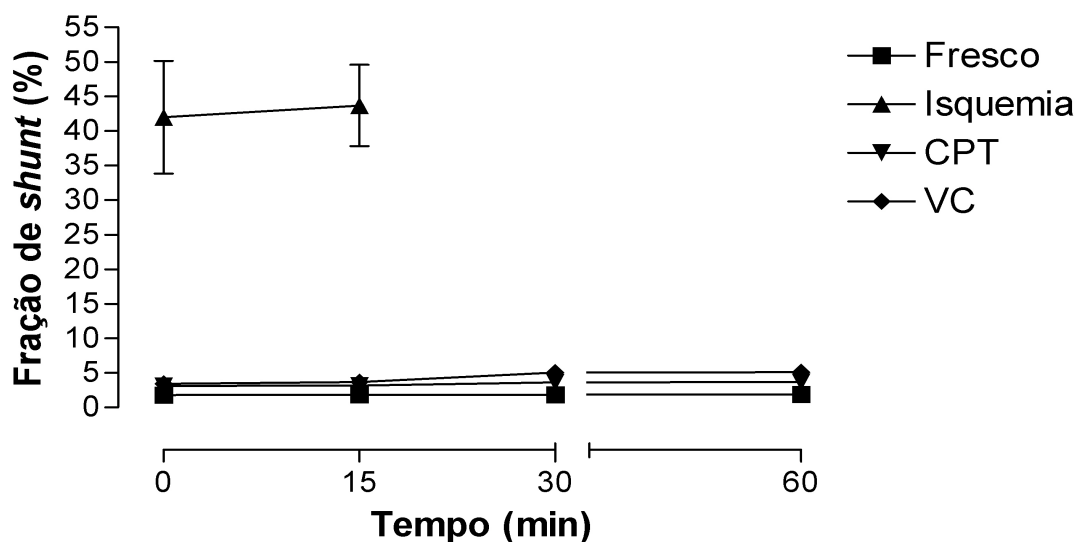


Figura 16: Fração de *shunt* durante os 60 minutos de reperfusão dos quatro grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos antes do início da reperfusão; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos antes do início da reperfusão. Os valores representam média  $\pm$  desvio-padrão de 8 blocos para cada grupo. No grupo que não foi submetido a manobras de recrutamentos pré-reperfusão (isquemia), o procedimento foi interrompido após 15 minutos devido a edema pulmonar fulminante.

### 4.2.2 Propriedades Mecânicas

A elastância dos pulmões não submetidos à manobra de recrutamento pré-reperfusão se elevou durante os primeiros 15 minutos de reperfusão ( $p=0,001$ ), enquanto que a dos grupos controle (minimamente lesados), CPT e VC permaneceu estável, sem modificação significativa, durante os 60 minutos de experimento.

Nos pulmões minimamente lesados, a elastância foi estatisticamente menor do que a dos grupos isquemia, CPT e VC durante todo período de reperfusão ( $p=0,0001$ ) – comparação intergrupos. Existiu diferença significativa do comportamento elástico entre os grupos CPT e VC durante todo o período de reperfusão, sendo a elastância do grupo VC maior que a do CPT ( $p=0,001$ ). O grupo isquemia foi o que apresentou, dentre todos os estudados, a maior elastância ( $p=0,0001$ ) (figura 17).

Do ponto de vista do componente resistivo, os valores obtidos dos pulmões dos grupos CPT e VC não se alteraram ao longo do período de reperfusão e apresentaram valores similares aos encontrados nos pulmões minimamente lesados, enquanto que a resistência dos pulmões do grupo isquemia foi maior que a dos demais ( $p=0,0001$ ) durante os primeiros 15 minutos de reperfusão (após o que a reperfusão foi interrompida devido a edema pulmonar fulminante) (figura 18).

### 4.2.3 Hemodinâmica Pulmonar

Nos pulmões do grupo isquemia, a  $P_{AP}$  e RVP aumentaram continuamente ao longo dos primeiros 15 minutos de reperfusão ( $p=0,0001$ ). Em contraste, nos demais grupos, estas variáveis permaneceram estáveis durante todo o período de reperfusão.

Durante o período de reperfusão, não houve diferença significativa da  $P_{AP}$  e da RVP entre os grupos CPT e VC. Entretanto, quando comparados aos pulmões minimamente lesados, estas variáveis foram maiores durante os 60 minutos de reperfusão ( $p=0,0001$ ). Em comparação ao grupo isquemia, tanto a  $P_{AP}$  e a RVP foram menores ( $p=0,0001$ ). As figuras 19 e 20 mostram o comportamento destas duas variáveis ao longo do tempo.

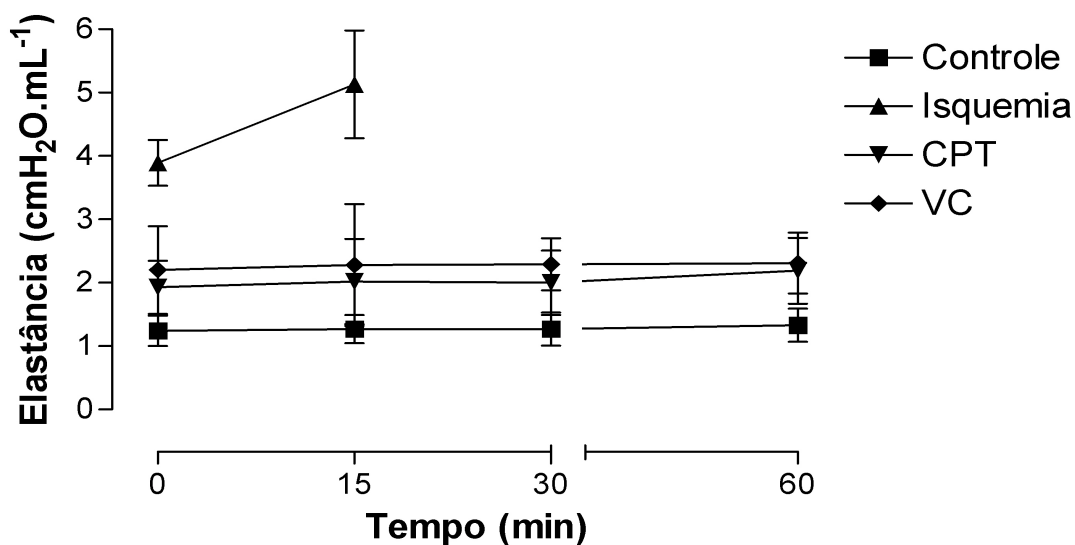


Figura 17: Elastância durante os 60 minutos de reperfusão dos quatro grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos antes do início da reperfusão; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos antes do início da reperfusão. Os valores representam média  $\pm$  desvio-padrão de 8 blocos para cada grupo. No grupo que não foi submetido a manobras de recrutamentos pré-reperfusão (isquemia), o procedimento foi interrompido após 15 minutos devido a edema pulmonar fulminante.

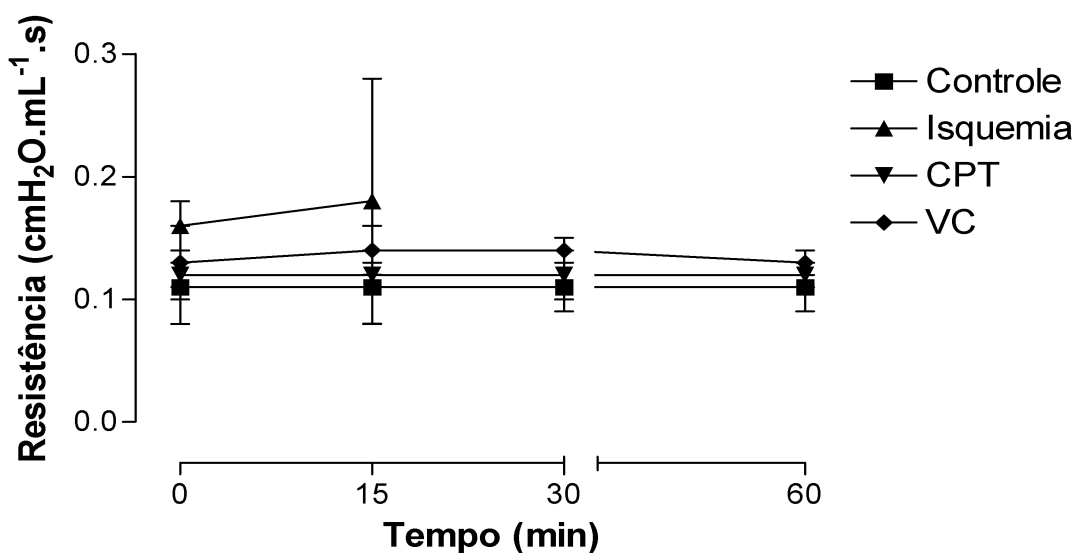


Figura 18: Resistência pulmonar durante os 60 minutos de reperfusão dos quatro grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos antes do início da reperfusão; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos antes do início da reperfusão. Os valores representam média  $\pm$  desvio-padrão de 8 blocos para cada grupo. No grupo que não foi submetido a manobras de recrutamentos pré-reperfusão (isquemia), o procedimento foi interrompido após 15 minutos devido a edema pulmonar fulminante.



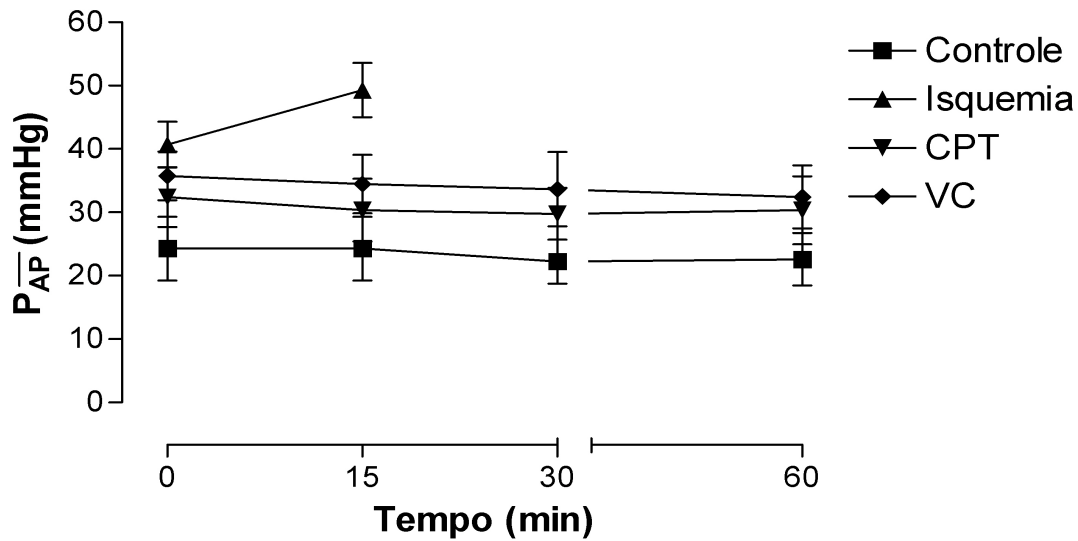


Figura 19: Pressão arterial pulmonar média durante os 60 minutos de reperfusão dos quatro grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos antes do início da reperfusão; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos antes do início da reperfusão. Os valores representam média  $\pm$  desvio-padrão de 8 blocos para cada grupo. No grupo que não foi submetido a manobras de recrutamentos pré-reperfusão (isquemia), o procedimento foi interrompido após 15 minutos devido a edema pulmonar fulminante.

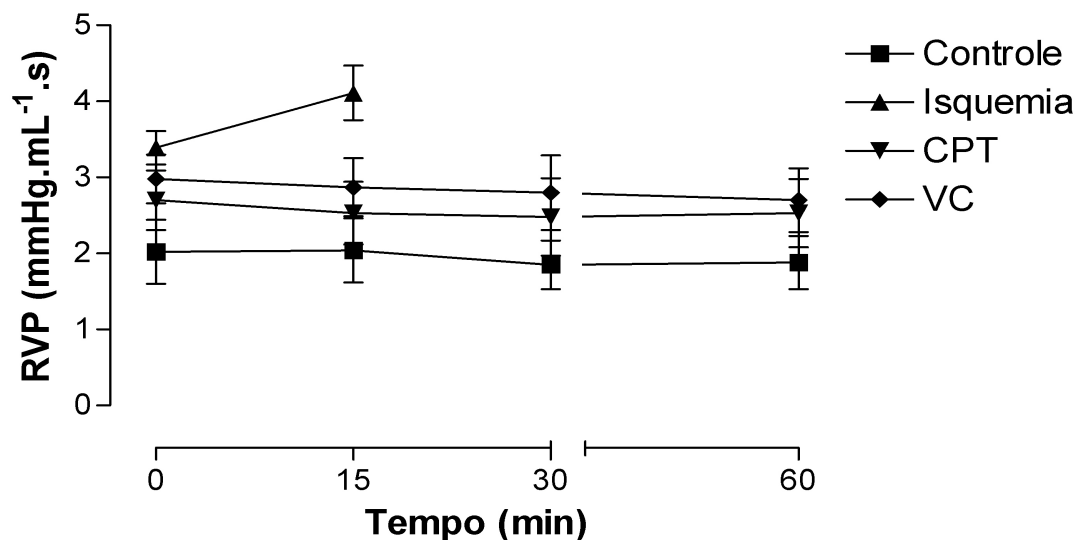


Figura 20: Resistência vascular pulmonar durante os 60 minutos de reperfusão dos quatro grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos antes do início da reperfusão; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos antes do início da reperfusão. Os valores representam média  $\pm$  desvio-padrão de 8 blocos para cada grupo. No grupo que não foi submetido a manobras de recrutamentos pré-reperfusão (isquemia), o procedimento foi interrompido após 15 minutos devido a edema pulmonar fulminante.

#### 4.2.4 Relação Peso líquido/Peso seco

A relação PL/PS dos pulmões do grupo CPT foi similar à dos minimamente lesados, entretanto, os grupos isquemia e VC apresentaram maior relação em comparação ao grupo controle ( $p=0,001$  e  $p=0,003$ , respectivamente) (figura 21).

#### 4.2.5 Análise Morfométrica

A análise morfométrica revelou que não há diferença significativa na porcentagem de área normal dos pulmões nos grupos controle e CPT. Em contraste, os pulmões do grupo VC apresentaram menor % de área alveolar normal quando comparados com os do CPT ( $p=0,001$ ) e com os do grupo controle ( $p=0,001$ ). Os pulmões do grupo isquemia foram os que apresentaram menor % de área alveolar normal ( $p=0,0001$  para todas as comparações).

A porcentagem de área colapsada foi similar entre os grupos controle e CPT, enquanto que no grupo VC, esta área foi significativamente maior do que a encontrada nos grupos controle ( $p=0,003$ ) e CPT ( $p=0,01$ ). Os pulmões do grupo isquemia foram os que apresentaram a maior área de colapso alveolar quando comparados à dos demais grupos ( $p=0,001$  para todas as comparações).

Não houve diferença significativa nos valores de área hiperinsuflada entre os grupos estudados ( $p=0,062$ )<sup>24</sup>, embora uma tendência a uma maior % de áreas hiperinsufladas tenha sido observada nos pulmões submetidos a recrutamento à CPT pré-reperfusão. As figuras 22, figura 23 e apresentam, respectivamente, a distribuição percentual das áreas normal e colapsadas nos quatro grupos estudados. Embora a distribuição dos dados de % de área alveolar hiperinsuflada tenha sido não-paramétrica, optamos por apresentá-la na forma de média  $\pm$  desvio-padrão para que a variação percentual em relação ao grupo controle pudesse ser visualizada.

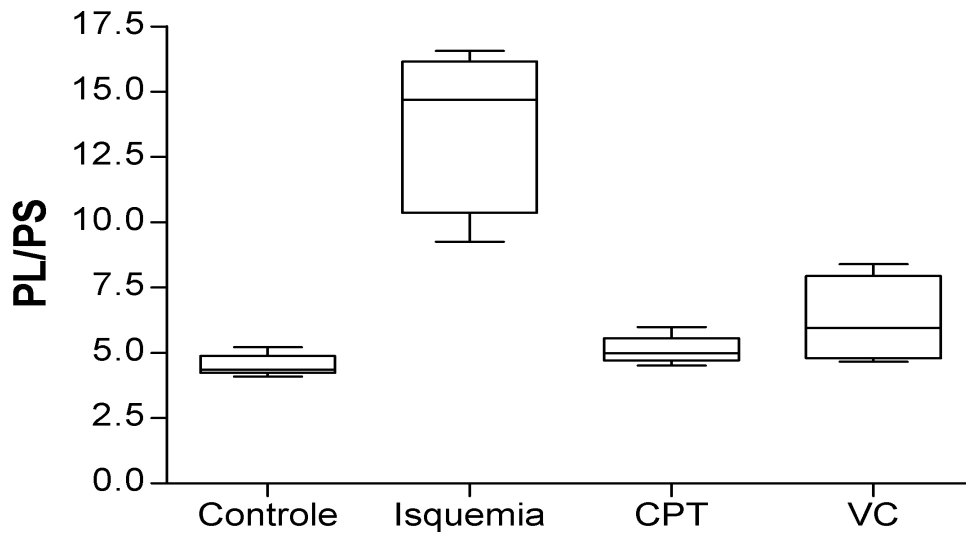


Figura 21: Peso líquido/peso seco dos quatro grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos antes do início da reperfusão; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos antes do início da reperfusão. Os valores representam o intervalo interquartil. Foram estudados 8 blocos em cada grupo.

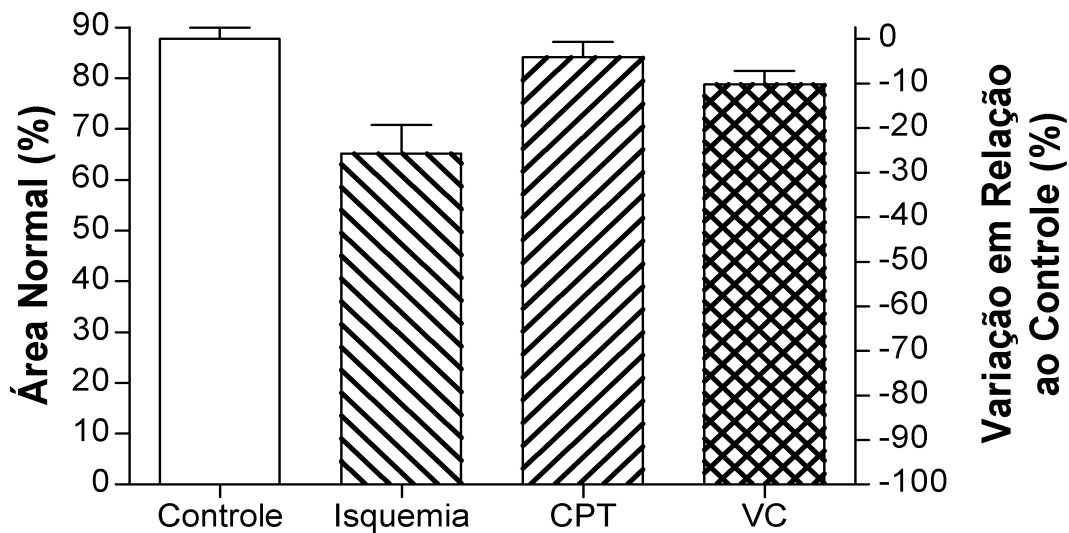


Figura 22: Porcentagem de área alveolar normal dos pulmões dos quatro grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos antes do início da reperfusão; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos antes do início da reperfusão. Os valores representam a média + desvio-padrão de 8 blocos estudados em cada grupo. O eixo Y da direita representa a variação percentual da área alveolar normal dos grupos isquemia, CPT e VC em relação ao grupo controle (0%).

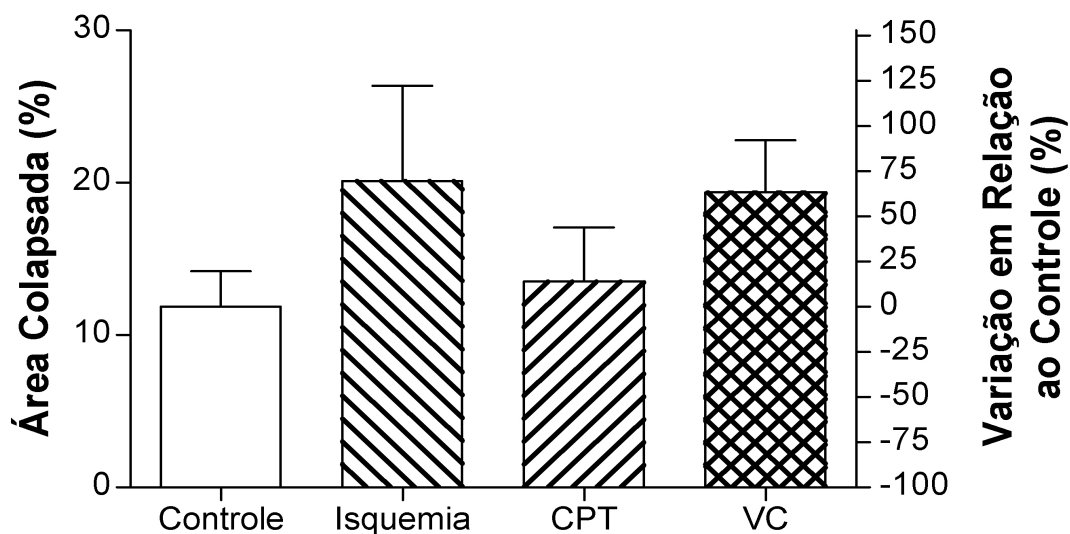


Figura 23: Porcentagem de área alveolar colapsada dos pulmões dos quatro grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos antes do início da reperfusão; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos antes do início da reperfusão. Os valores representam a média + desvio-padrão de 8 blocos estudados em cada grupo. O eixo Y da direita representa a variação percentual da área alveolar colapsada dos grupos isquemia, CPT e VC em relação ao grupo controle (0%).

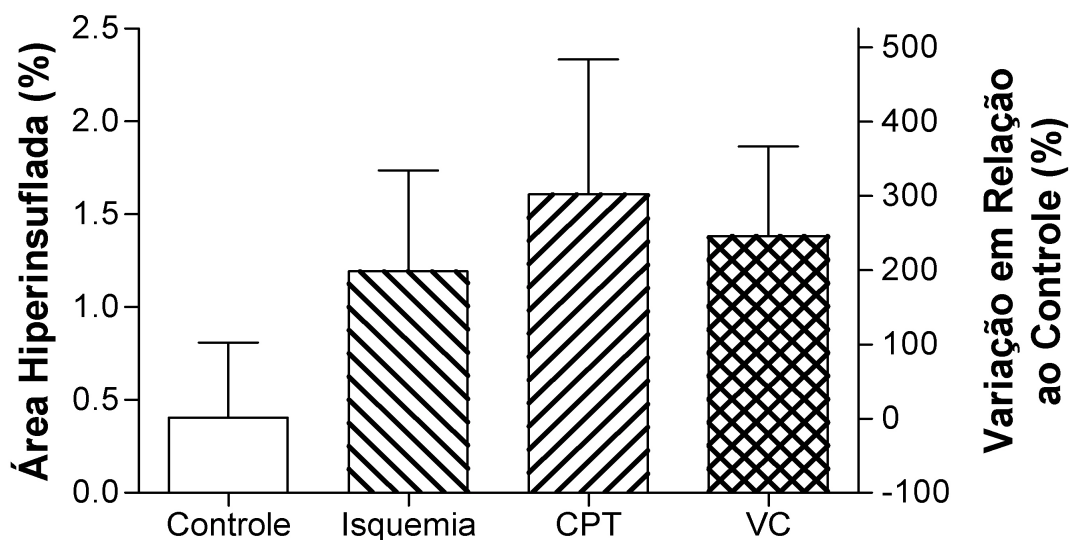


Figura 24: Porcentagem de área alveolar hiperinsuflada dos pulmões dos quatro grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos antes do início da reperfusão; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos antes do início da reperfusão. Os valores representam a média + desvio-padrão de 8 blocos estudados em cada grupo. O eixo Y da direita representa a variação percentual da área alveolar hiperinsuflada dos grupos isquemia, CPT e VC em relação ao grupo controle (0%).

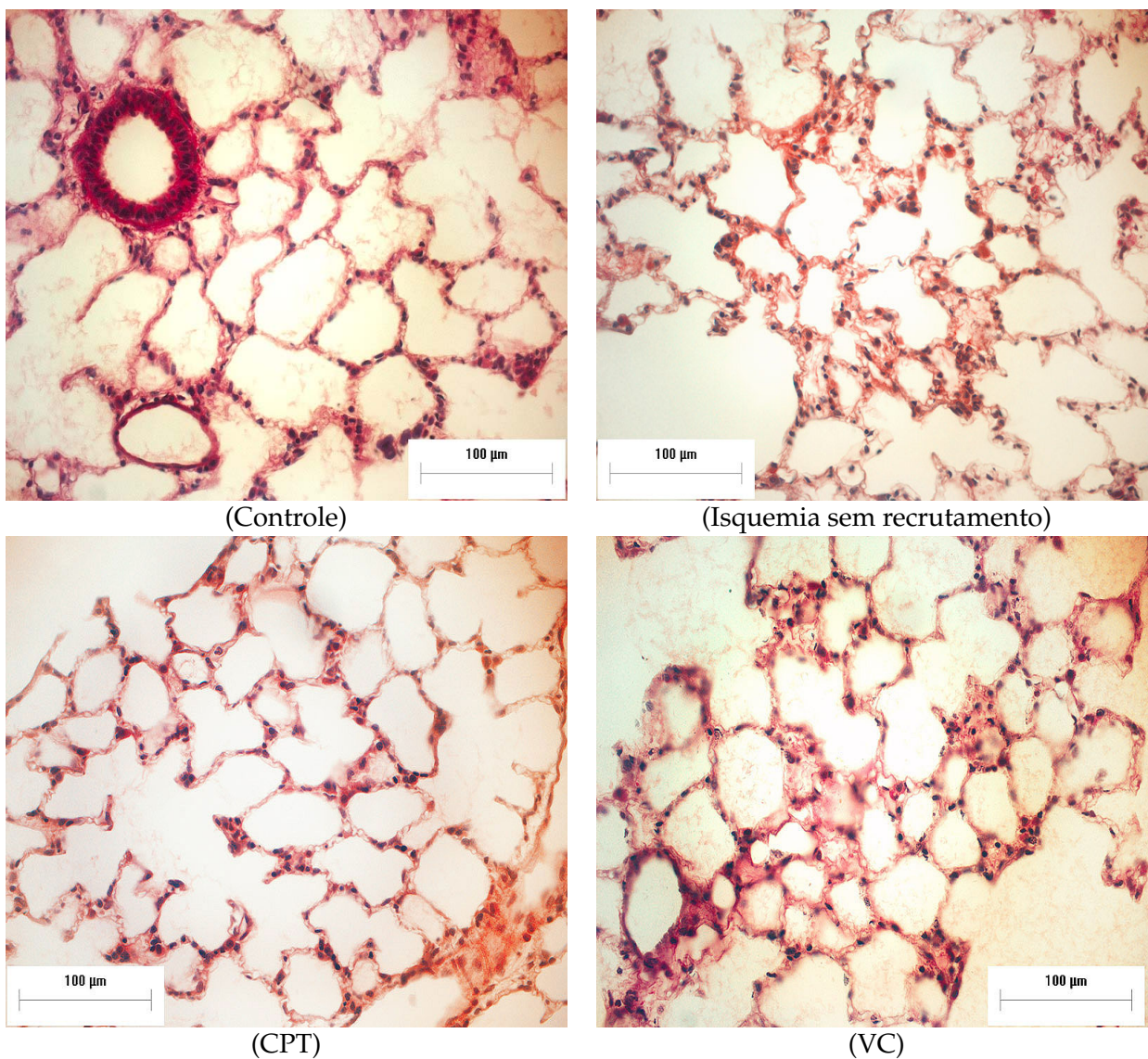


Figura 25: Coloração por hematoxilina–eosina (HE); aumento 400x. Parênquima pulmonar representativo dos pulmões dos grupos: controle, isquemia, CPT e VC. **Controle:** distribuição homogênea da ventilação; os alvéolos apresentam diâmetro normal, não há evidência de alvéolos colapsados nem hiperinsuflados. **Isquemia sem recrutamento:** Evidência de alvéolos colapsados. **CPT:** Presença de alvéolos hiperinsuflados e de tamanho normal. **VC:** Distribuição inhomogênea da ventilação; alvéolos de diâmetro normal, colapsados e hiperinsuflados; presença de edema intra-alveolar.

## 4.3 Fase 3

### 4.3.1 Propriedades Mecânicas

As figuras 26 e 27 demonstram que o  $\dot{V}$  e o  $V$  administrados durante a ventilação mecânica para medida das propriedades mecânicas pulmonares foram similares nos cinco grupos estudados. Desta forma, os dados mecânicos obtidos nesta fase experimental não se devem à variação das variáveis independentes nos cinco grupos estudados [66, 67, 68].

O procedimento do FVP e a consequente substituição do sangue da circulação pulmonar por solução de Euro-Collins e a preservação dos pulmões durante 10 horas a 4 °C alteraram, de forma significativa, os componentes viscoso, viscoelástico e elástico do comportamento mecânico pulmonar.

A dissipação de energia no componente Newtoniano de força foi similar em todos os grupos estudados, embora, no grupo isquemia,  $\Delta P1$  tenha apresentado tendência de queda em relação aos pulmões minimamente lesados ( $p=0,05$ ). Figura 28.

Os dados indicam que a periferia pulmonar foi a que, mecanicamente, mais se alterou com o *flush* e com a isquemia fria. No grupo isquemia, imediatamente após a substituição do sangue da circulação pulmonar pela solução de Euro-Collins, a dissipação de energia nos componentes viscoelásticos pulmonares aumentou 83% em relação aos valores do grupo controle ( $p=0,00001$ ) e permaneceu inalterada após o período de isquemia fria, figura 29. O recrutamento alveolar à CPT diminuiu de forma significativa os valores de  $\Delta P2$  em relação aos dos grupos *flush* e isquemia ( $p=0,05$  e  $p=0,03$ , respectivamente) mas o  $\Delta P2$  ainda permaneceu mais elevado que os valores dos pulmões minimamente lesados ( $p=0,01$ ), indicando que a aplicação dessa estratégia após a preservação restabeleceu, pelo menos em parte, as características mecânicas dos pulmões. A figura 29 demonstra ainda que o comportamento de  $\Delta P2$  dos blocos que foram ventilados com volume corrente 10 minutos antes do restabelecimento do fluxo sanguíneo pulmonar, foi similar aos que foram recrutados à CPT no período pré-reperfusão: diminuiu em relação ao dos grupos *flush* e isquemia ( $p=0,04$  e  $p=0,008$ , respectivamente) e foi maior que o do grupo controle ( $p=0,008$ ). Não houve diferença significativa de  $\Delta P2$  entre os grupos CPT e VC. Figura 29.

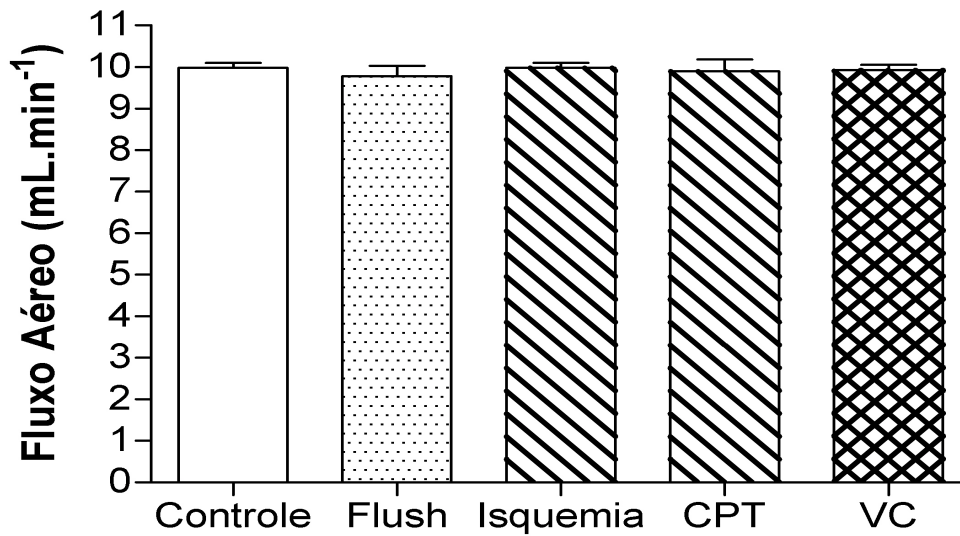


Figura 26: Fluxo aéreo administrado durante a ventilação mecânica dos pulmões dos grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos. As barras representam a média + desvio-padrão de dez medidas para cada rato. Todos os grupos  $n = 8$ .

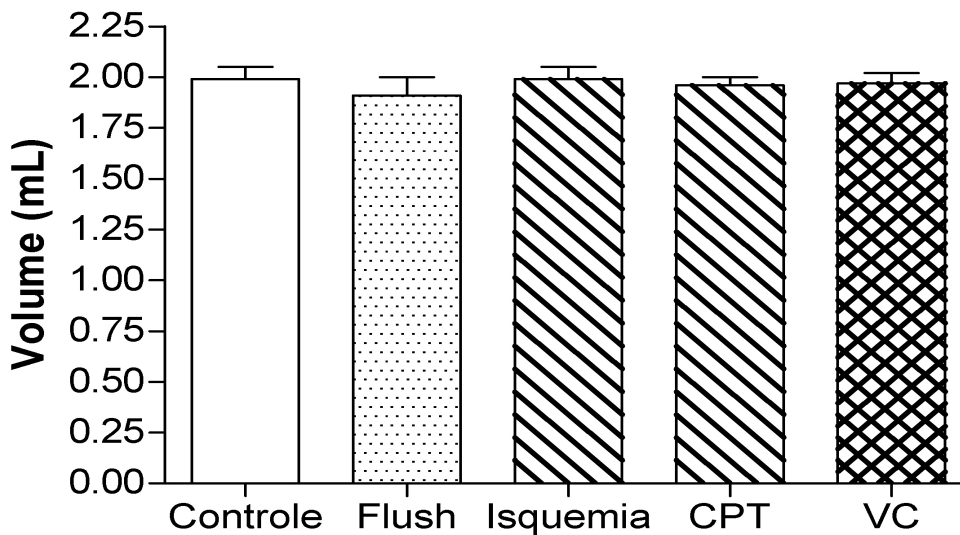


Figura 27: Volume administrado durante a ventilação mecânica dos pulmões dos grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos. As barras representam a média + desvio-padrão de dez medidas para cada rato. Todos os grupos  $n = 8$ .



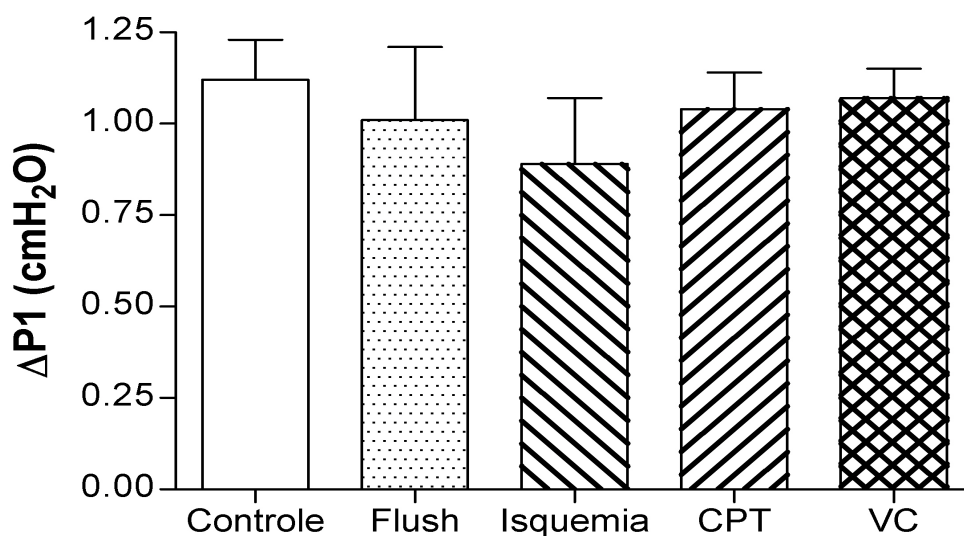


Figura 28: Dissipação de energia no componente viscoso pulmonar dos grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos. As barras representam a média + desvio-padrão de dez medidas para cada rato. Todos os grupos  $n = 8$ .

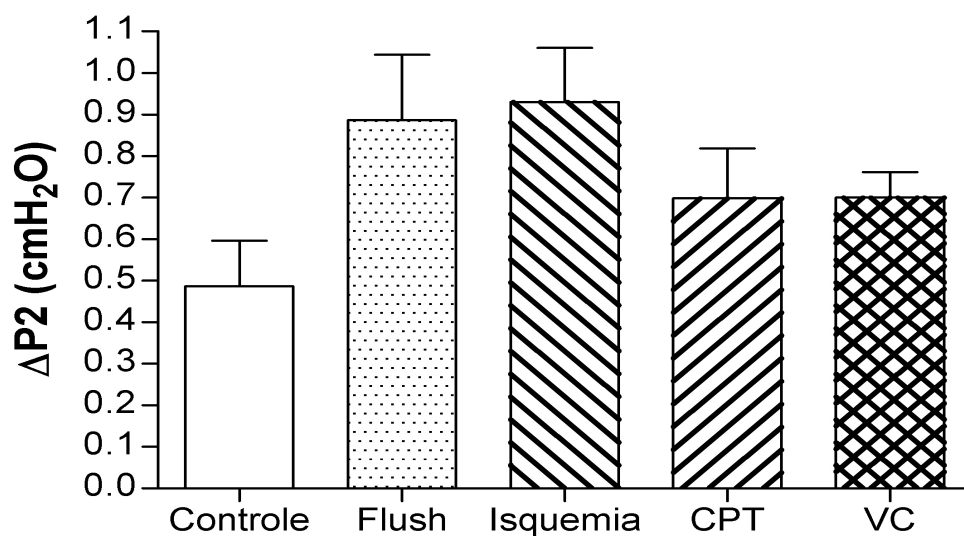


Figura 29: Dissipação de energia no componente viscoelástico pulmonar dos grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos. As barras representam a média + desvio-padrão de dez medidas para cada rato. Todos os grupos  $n = 8$ .

Em relação ao grupo controle, a elastância estática (Est) do grupo flush aumentou 93,4% ( $p=0,00001$ ), mas não se alterou significativamente após a preservação a frio, figura 30. A Est do grupo CPT foi similar à do controle mas, menor do que a encontrada nos grupos VC ( $p=0,0001$ ), flush e isquemia ( $p=0,001$  para ambas comparações). O emprego da ventilação com volume corrente por dez minutos antes do início da reperfusão reduziu a Est em comparação aos pulmões submetidos ao *flush* e à isquemia fria ( $p=0,001$  para ambas comparações). Figura 30.

Os resultados da regressão logística em que as variáveis mecânicas  $\Delta P1$ ,  $\Delta P2$ , Edyn, Est e Rinit foram consideradas como independentes, e "edema pulmonar", a variável dependente, mostraram que a Est é a variável de grande importância para o desenvolvimento da lesão pulmonar I/R ( $p=0,003$ ). Quando aumentada, seu *odds ratio* para desenvolvimento da lesão é de 4,9. O índice de Nagelkerke desta análise foi de 0,54.

#### 4.3.2 Análise Morfométrica

Em relação aos pulmões minimamente lesados, o FVP reduziu a porcentagem de área alveolar com diâmetro normal ( $p=0,03$ ) figura 31, e tendeu a se acentuar no grupo isquemia após 10 horas de preservação hipotérmica, mas esta redução adicional no diâmetro alveolar não logrou significância estatística. O recrutamento alveolar à CPT aumentou a % de área alveolar normal em relação aos pulmões do grupo isquemia ( $p=0,02$ ) tornando este valor similar ao do grupo controle. A estratégia de ventilação com volume corrente por dez minutos antes do início da reperfusão aumentou a % de área alveolar normal e a tornou similar à encontrada nos demais grupos, a exceção do controle ( $p=0,03$ ). Estes dados estão mostrados na figura 31.

A porcentagem de área colapsada aumentou 77% após o *flush* ( $p=0,001$ ) mas não houve aumento adicional significativo após 10 horas de preservação hipotérmica. A insuflação dos pulmões à CPT reduziu, como esperado, a % de área pulmonar colapsada em relação aos pulmões dos grupos flush ( $p=0,0001$ ) e isquemia ( $p=0,0001$ ), tornando seu valor similar ao dos pulmões minimamente lesados. Em contraste, a ventilação com VC durante 10 minutos não alterou, de forma significativa, a % de área alveolar colapsada (figura 32).

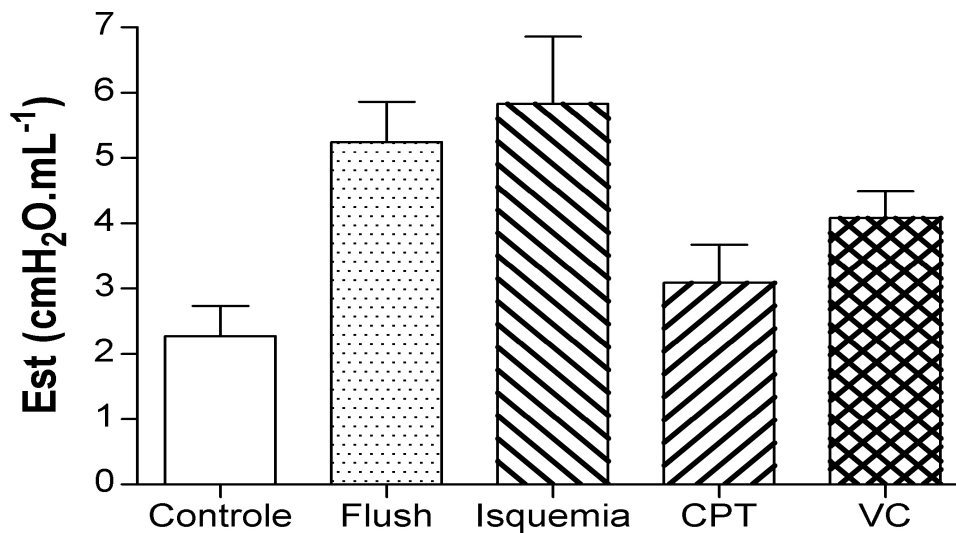


Figura 30: Elastância estática dos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos. As barras representam a média + desvio-padrão de dez medidas para cada rato. Todos os grupos  $n = 8$ .

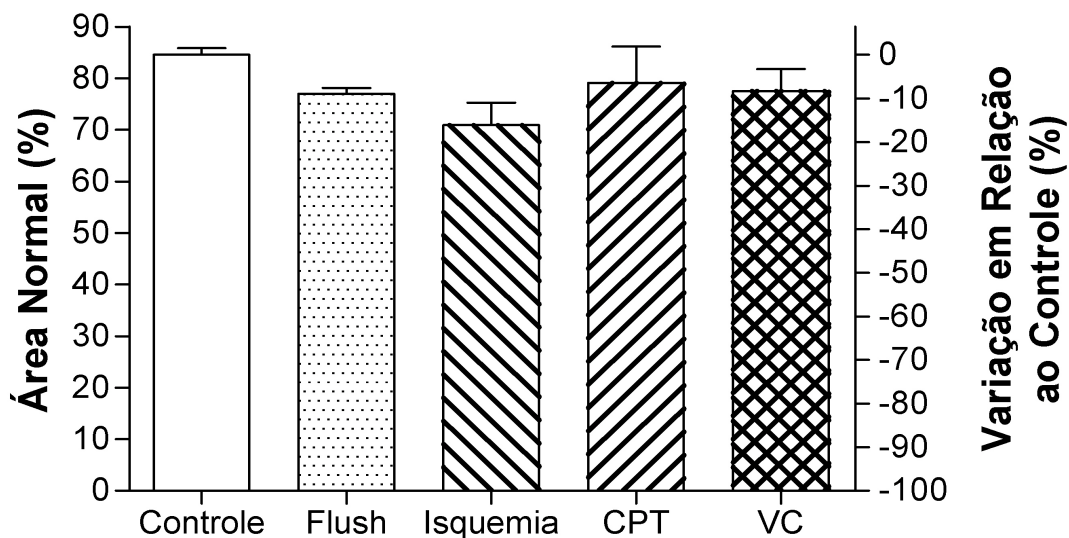


Figura 31: Porcentagem de área do parênquima pulmonar normal dos grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos. As barras representam a média + desvio-padrão de 8 blocos estudados em cada grupo. O eixo Y da direita representa a variação percentual da área alveolar normal dos grupos flush, isquemia, CPT e VC em relação ao grupo controle (0%).

A substituição do sangue da circulação pulmonar por solução de Euro-Collins não alterou, em comparação com os pulmões minimamente lesados, a porcentagem de área hiperinsuflada. Após dez horas de isquemia fria, a área de hiperinsuflação aumentou 52% em relação aos pulmões do grupo controle ( $p=0,001$ ), figura 33. Das estratégias ventilatórias utilizadas, a insuflação pulmonar à CPT foi a que mais alterações causou, sendo responsável por aumentar ainda mais a área de hiperinsuflação ( $p<0,01$  para todas as comparações). A % de área hiperinsuflada no grupo VC foi similar a dos demais grupos, exceto à do grupo CPT ( $p=0,0001$ ). (figura 33).

A figura 34 mostra fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar nos grupos cinco estudados.

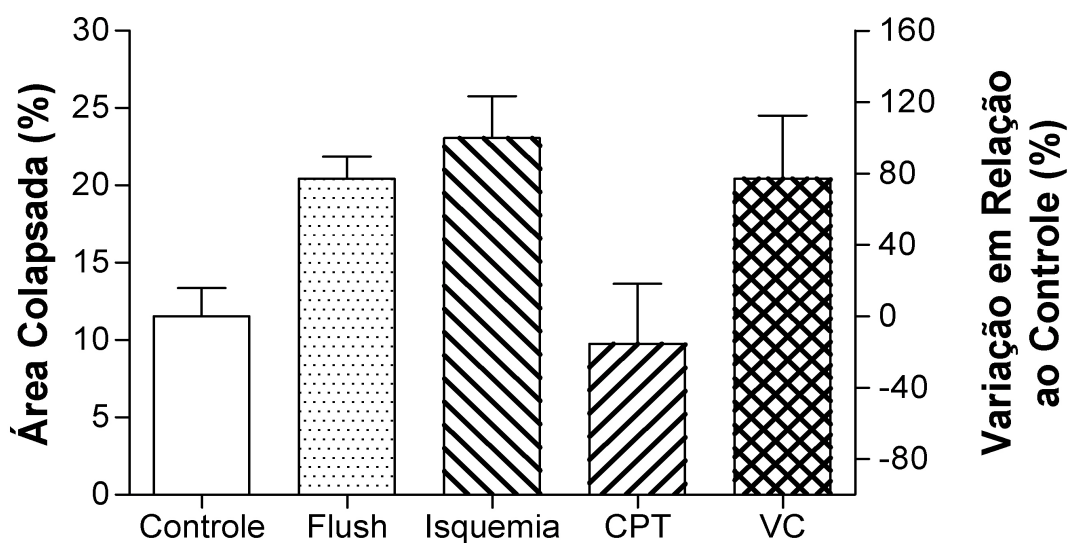


Figura 32: Porcentagem de área do parênquima pulmonar colapsada dos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos. As barras representam a média + desvio-padrão de 8 blocos estudados em cada grupo. O eixo Y da direita representa a variação percentual da área alveolar colapsada dos grupos flush, isquemia, CPT e VC em relação ao grupo controle (0%).

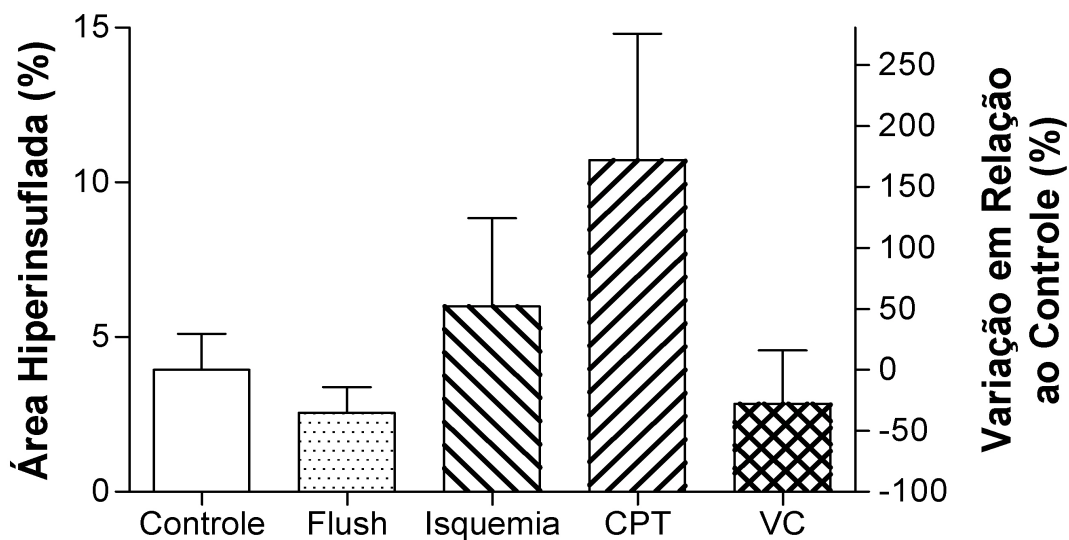


Figura 33: Porcentagem de área do parênquima pulmonar hiperinsuflada dos grupos estudados. CPT = recrutamento à capacidade pulmonar total por 2 minutos; VC = ventilação com volume corrente por 10 minutos. As barras representam a média + desvio-padrão de 8 blocos estudados em cada grupo. O eixo Y da direita representa a variação percentual da área alveolar hiperinsuflada dos grupos flush, isquemia, CPT e VC em relação ao grupo controle (0%).

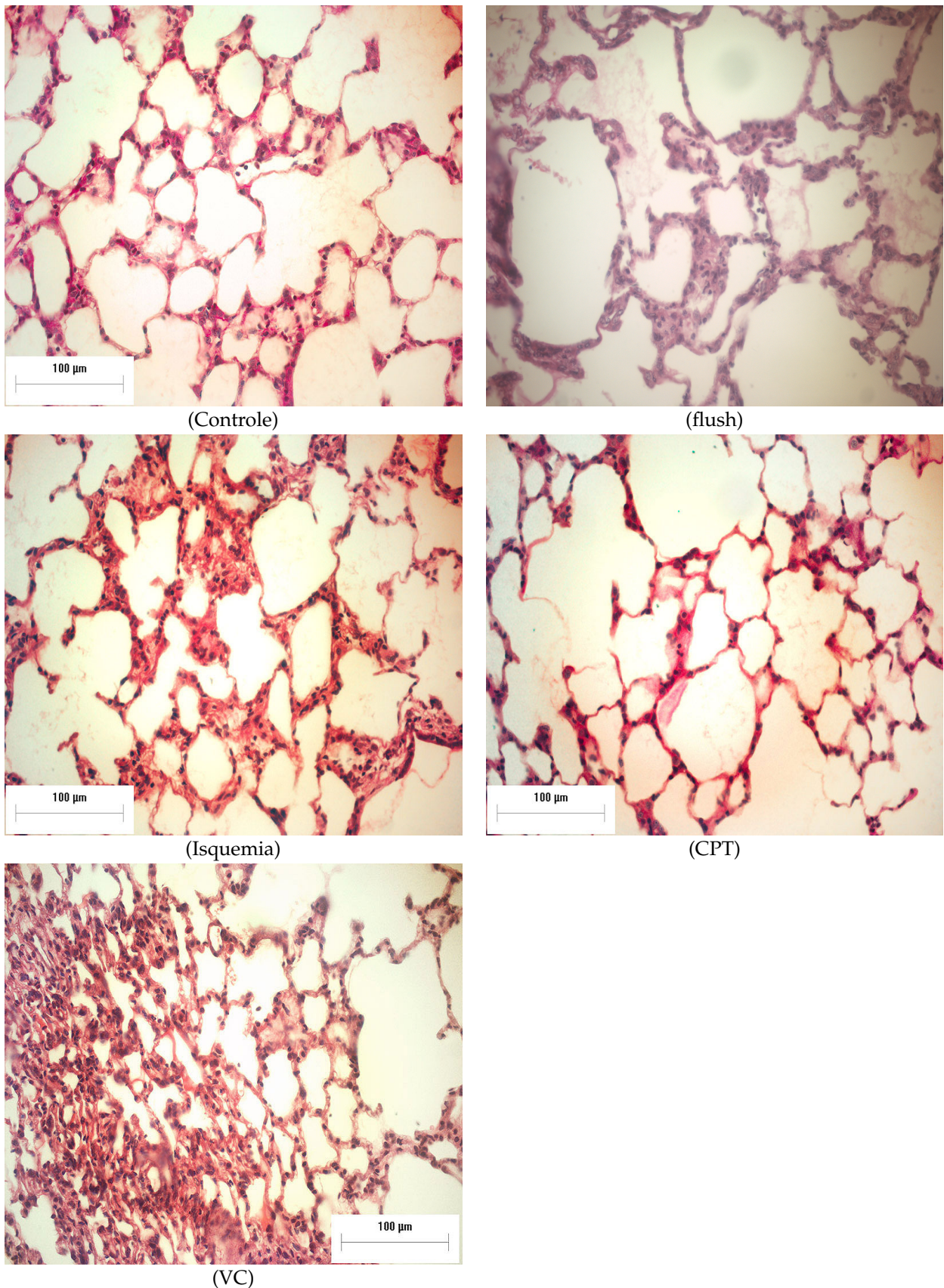


Figura 34: Coloração por hematoxilina–eosina (HE); aumento 400x. Parênquima pulmonar representativo dos pulmões dos grupos: controle, flush, isquemia, CPT e VC. **Controle:** distribuição homogênea da ventilação; alvéolos de diâmetro normal. **Flush** Presença de alvéolos colapsados. **Isquemia:** Presença de alvéolos hiperinsuflados e de tamanho normal. **CPT:** Distribuição mais homogênea da ventilação; alvéolos de diâmetro normal e hiperinsuflados. **VC:** alvéolos colapsados.

## 5 Discussão

Embora reproduzível e aparentemente simples, o modelo de reperfusão pulmonar *ex-vivo* P-P desenvolvido por DeCampos e cols. [45] apresenta aspectos técnicos críticos e de extrema relevância para seu perfeito funcionamento. Estes pontos precisam ser controlados para que os resultados obtidos com a sua utilização sejam confiáveis.

A estabilidade do modelo depende criticamente da integridade e da função dos pulmões-desoxigenadores. Como já demonstrado por vários autores [69, 70, 71], a hipóxia alveolar *per se* poderia liberar mediadores pró-inflamatórios e induzir a disfunção pulmonar que, em teoria, poderiam contribuir para a disfunção dos pulmões-estudo, da mesma maneira que a lesão pulmonar I/R dos pulmões-estudo tenha liberado mediadores pró-inflamatórios que, por sua vez, diminuiriam a capacidade de os blocos-desoxigenadores produzirem sangue venoso.

Como a composição gasosa, o comportamento mecânico e hemodinâmico durante todo período de reperfusão, a relação peso líquido/peso seco e a distribuição das porcentagens de áreas pulmonares normais, colapsadas e hiperinsufladas obtidas ao final do experimento foram comparáveis a de pulmões minimamente lesados, tudo indica que a ventilação hipóxica dos blocos-desoxigenadores não causou maiores problemas, muito embora as medidas realizadas neste estudo não foram suficientemente refinadas para detectar disfunções pulmonares "subclínicas".

Os regimes ventilatórios utilizados para os pulmões-estudo e desoxigenadores também mereceram atenção. É sabido que a lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica resulta de complexa relação de forças mecânicas que atuam nos tecidos pulmonares durante ventilação com pressão positiva [72] e que resulta em alteração do balanço dos fluidos pulmonares, no aumento da permeabilidade epitelial e endotelial e grave lesão tecidual [32, 73, 74]. Como nos pulmões minimamente lesados não houve incremento da relação peso líquido/peso seco, e as variáveis gasométricas, mecânicas e hemodinâmicas se mantiveram constantes e dentro da faixa de normalidade durante o período de reperfusão, é de se supor que as estratégias ventilatórias utilizadas também não foram fonte causadora de lesão pulmonar.

Com o intuito de manter a relação  $\dot{V}_A/\dot{Q}$  dos blocos-estudo e desoxigenador adequada, isto é, para que pulmões minimamente lesados ventilados com ar ambiente produzissem sangue arterial e os desoxigenadores, com mistura gasosa hipóxica, sangue venoso, o volume corrente administrado para todos os pulmões deveria ser de aproximadamente 3 e 4 mL, respectivamente. Como os pulmões-estudo poderiam ter sua impedância alterada devido às intervenções empregadas, a opção, para estes blocos, foi utilizar o ventilador controlado a volume. Este equipamento não possuía nenhum dispositivo que realizasse pausa ao final da inspiração e nem ao final da expiração, portanto, o método empregado para o estudo da resistência total e da elastância pulmonar foi o da técnica linear de ajuste pelos mínimos quadrados [50, 51]. Esta metodologia, por utilizar o modelo linear unicompartimental como referencial teórico, apresenta duas limitações: (i) a resistência pulmonar estimada é a total e não há como discernir entre a das vias aéreas e a do tecido e (ii) não permite o estudo do comportamento viscoelástico dos pulmões.

Por outro lado, o modelo de reperfusão isolada *ex-vivo* P-P apresenta vantagens em relação a outros modelos de reperfusão de pulmões isolados [6, 75, 76, 77, 78]: (i) a reperfusão é realizada com sangue autólogo e não com perfusatos, o que possibilita o estudo das trocas gasosas e da fração de *shunt*, além do que a utilização de perfusatos aumenta a propensão ao desenvolvimento de edema alveolar; (ii) a estabilidade do sistema dá condições para estudar a função pulmonar por até quatro horas ininterruptas; (iii) relativo pouco volume de sangue para preencher os circuitos de circulação, isto é, quatro ratos com peso aproximado de 300 gramas são suficientes para montagem do sistema; (iv) o modelo *per se* não é causa de lesão dos pulmões em estudo, (v) não depende da condição hemodinâmica de outro animal e (vi) possui relativo baixo custo.

O modelo de reperfusão pulmonar P-P *ex-vivo* descrito por DeCampos [45], e adaptado às condições logísticas do Laboratório de Fisiologia Respiratória Experimental da UnB, se manteve estável e sob condições fisiológicas durante uma hora de funcionamento, e isto nos permitiu coletar dados das trocas gasosas, da hemodinâmica e da mecânica ventilatória dos pulmões em estudo durante todo este período. Nesta fase, a taxa de sucesso das reperfusões foi de 100%, isto é, nenhum experimento foi descartado. Em todos os experimentos, a adição periódica de  $\text{NaHCO}_3^-$  foi necessária para manter o pH do sangue circulante dentro



da faixa de normalidade.

A diferença encontrada nos valores de elastância e de resistência entre os blocos-estudo e desoxigenadores se deve a fato de que nos pulmões desoxigenadores, a taxa de fluxo aéreo administrada durante a ventilação mecânica foi maior, a onda de fluxo era quadrada e o tempo inspiratório era menor que os dos pulmões-estudo. Como as estratégias ventilatórias foram diferentes para os dois blocos, pulmões-estudo e desoxigenadores se tornam incomparáveis. Assim, nesses dois grupos, as comparações realmente relevantes são aquelas feitas dentro do mesmo grupo, a intervalos de reperfusão diferentes. Essas comparações permitem acessar os efeitos do fator tempo de reperfusão, e portanto, do próprio sistema sobre a estabilidade funcional dos pulmões-estudo e desoxigenadores. As diferentes estratégias ventilatórias nos pulmões-estudo e desoxigenadores foram necessárias para otimizar a relação ventilação-perfusão ( $\dot{V}_A/\dot{Q}$ ) de cada bloco.

O fato de as estratégias ventilatórias com diferentes valores de frequência respiratória, de volume corrente e de pressão positiva ao final da expiração terem produzido distribuição percentual de área alveolar de tamanho normal, colapsada e hiperinsuflada similar nos pulmões-estudo e desoxigenadores, ocorreu, possivelmente, porque ambas estratégias ventilaram os pulmões na mesma região da curva pressão-volume (P-V). Os pulmões-estudo e desoxigenadores não foram ventilados nem no extremo inferior nem no superior da curva P-V.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a substituição do sangue da circulação pulmonar pelo *flush* com solução de Euro-Collins, e as dez horas de isquemia fria, desarranjaram, de forma significativa, a arquitetura alveolar e aumentaram as inhomogeneidades mecânicas pulmonares. Tais desarranjos aumentaram a susceptibilidade dos pulmões à disfunção causada pela reperfusão. O restabelecimento abrupto do fluxo sanguíneo dos pulmões isquêmicos causou lesão de I/R com deterioração das trocas gasosas, das propriedades mecânicas e hemodinâmica além de dano estrutural causado à barreira sangue-gás. Contudo, quando as mudanças arquiteturais e mecânicas foram parcialmente revertidas ou pelo menos amenizadas pelas estratégias ventilatórias empregadas no período pós-preservação e pré-reperfusão, a susceptibilidade à lesão diminuiu e o funcionamento pulmonar foi similar ao de pulmões minimamente lesados.

A susceptibilidade à lesão I/R está associada, dentre outros fatores, ao comportamento mecânico pulmonar presente imediatamente antes do início da reperfusão. Quanto maior for sua impedância, maior será o estresse mecânico causado por altas pressões geradas nas vias aéreas e na microvasculatura pulmonar, ou seja, maior o risco para desenvolver a lesão I/R.

As alterações estruturais e mecânicas pulmonares ocorreram imediatamente após a substituição do sangue da circulação pulmonar pela solução de Euro-Collins. Esta substituição foi responsável pelo aumento de 77% de área colapsada que, por sua vez, formou inúmeras constantes de tempo dentro dos pulmões, aumentou em 83% a dissipação de energia nos componentes viscoelásticos e/ou nas inomogeneidades pulmonares e foi responsável pelo incremento de 93,4% da elastância estática pulmonar.

Estas modificações causadas pelo *flush* podem ter decorrido da influência dos fatores hemodinâmicos responsáveis pela estabilidade mecânica do parênquima pulmonar e/ou por alterações da estrutura e função do surfactante. As pressões arterial e venosa [79, 80] e o fluxo sanguíneo pulmonar ( $\dot{Q}_p$ ) [81, 82] influenciam, de forma significativa, a estabilidade e o comportamento mecânico dos pulmões, isto porque o septo alveolar é moldado pela interação de três forças: (i) a tensão superficial da interface ar-líquido; (ii) a tensão tecidual dada pelas fibras elásticas e colágenas que compõem o tecido pulmonar e (iii) pela pressão capilar [83, 84]. A congestão vascular pulmonar [79, 80, 85, 86] e a hipoperfusão são condições hemodinâmicas que alteram a CRF e a rigidez da parede alveolar. Peták e cols. [75] demonstraram, em modelo de pulmão isolado de ratos, que a estabilidade mecânica e a impedância do parênquima pulmonar dependem da pressão capilar. Estes mesmos autores mostraram, com uso do modelo de fase constante proposto por Hántos [87], que a hipoperfusão era a responsável pelo aumento da elastância (H) e da resistência do tecido pulmonar (R<sub>tis</sub>) e que, uma vez restabelecida a reperfusão, a H e a R<sub>tis</sub> diminuíram 37% e 17,8%, respectivamente, além de ter havido incremento do volume expiratório final. A análise histológica dos pulmões submetidos à hipoperfusão revelou que na ausência de pressão no capilar pulmonar os contornos alveolares estavam torcidos e que o restabelecimento das pressões fisiológicas dos capilares pulmonares devolveu aos alvéolos sua geometria ótima. Sendo assim, é plausível supor que a solução de Euro-Collins, por não conter, em sua composição, nenhum fator

que mantenha a pressão oncótica capilar, tenha desestabilizado mecanicamente o tecido pulmonar aumentando as áreas de colapso e as inomogeneidades pulmonares.

Ressalte-se também que a perturbação causada pelo *flush* na periferia pulmonar pode ter sido resultado da inativação do surfactante. Andrade e cols. [33] avaliaram a composição e a biosíntese do surfactante imediatamente, 6 e 12 horas após a realização do *flush* da circulação pulmonar com solução modificada de Euro-Collins e mostraram que as concentrações da fosfatidilcolina e do fosfatidilglicerol (principais fosfolipídeos do surfactante), obtidas pela análise do lavado broncoalveolar diminuíram significativamente logo após o *flush*.

A preservação a frio também contribuiu para a modificação da arquitetura alveolar. Após as dez horas de isquemia fria, a porcentagem de área hiperinsflada aumentou 52% em relação aos pulmões minimamente lesados e 130% em relação aos submetidos ao *flush*. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Ikeyama e cols. [88]. Também com a utilização do método de fase constante, estes autores mostraram queda significativa da resistência das vias aéreas de pulmões preservados por 24 horas a 4 °C. Ikeyama e cols. especularam que este fenômeno poderia ser atribuído a alterações do diâmetro das vias aéreas causadas pelas mudanças estruturais, ocorridas durante a preservação a frio, do parênquima pulmonar que as rodeiam.

O rápido desenvolvimento das alterações das trocas gasosas com conseqüente hipoxemia visto na lesão de isquemia-reperfusão é similar a apresentada em pulmões com lesão pulmonar aguda (LPA) e com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) [89], já que o dano às barreiras epitelial e endotelial e o extravasamento de conteúdo protéico plasmático para o espaço alveolar representam o evento mais importante no mecanismo fisiopatológico da hipoxemia.

A hipoxemia percebida nos pulmões do grupo isquemia foi causada por fatores pulmonares, visto que o fluxo sanguíneo e a  $PvO_2$  no modelo P-P foram mantidas constantes ao longo de todo período de reperfusão, além do que os parâmetros ventilatórios utilizados para ventilar estes pulmões produziram, em pulmões minimamente lesados, valores normais de  $PaO_2$  e de fração de *shunt*.

Nos pulmões do grupo isquemia, aqueles que não foram submetidos a nenhuma

estratégia ventilatória pré-reperusão, a alta fração de *shunt* e o desenvolvimento da hipoxemia aconteceram imediatamente após o início da reperusão. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por DeCampos e cols. [34] cuja especulação foi a de que mesmo preservados e insuflados a 50% da CPT, no período de isquemia fria haveria formação de colapso alveolar e de áreas de atelectasias, e que nestas condições, haveria desigualdade da distribuição do fluxo sanguíneo pulmonar.

Morfometricamente, a grande porcentagem de áreas pulmonares colapsadas e hiperinsufladas e a redução da área com alvéolos de tamanho normal, tudo causado pelo *flush* e pela isquemia fria, levaram à distribuição desigual da ventilação e da perfusão com consequente desequilíbrio da relação  $\dot{V}_A/\dot{Q}$ , ou seja, o fluxo sanguíneo foi distribuído para alvéolos mal e não-ventilados. Deve ser enfatizado que na lesão I/R, a anormalidade mais importante das trocas gasosas é o *shunt*, e que este pode ocorrer por absorção de gás causada pelo fechamento das vias aéreas distais, redução da ventilação abaixo de um nível crítico da relação  $\dot{V}_A/\dot{Q}$  e deficiência do surfactante. O aumento da relação peso líquido/peso seco e a presença de edema visto na análise microscópica dos tecidos pulmonares permitem afirmar que houve ruptura da barreira sangue-gás, extravasamento de proteínas plasmáticas para o espaço alveolar com concomitante formação de edema e inativação do surfactante. Isto contribuiu para a instabilidade dos alvéolos e aumento da porcentagem de área pulmonar colapsada visto na análise morfométrica o que, possivelmente, perpetuou a distribuição desigual da relação  $\dot{V}_A/\dot{Q}$ .

É possível que os resultados deste trabalho estejam de acordo com os encontrados por Hermle e cols. [90] que, com a utilização da técnica de eliminação de gases inertes múltiplos (TEGIM) desenvolvida por Wagner e cols. [91, 92], mostraram que em pulmões submetidos a lesão I/R existe fluxo sanguíneo direcionado para áreas pulmonares não-ventiladas ( $\dot{V}_A/\dot{Q} < 0,005$ ), para áreas mal-ventiladas ( $\dot{V}_A/\dot{Q} < 0,01$ ), além de grande desequilíbrio entre a ventilação e a perfusão pulmonares nas áreas de distribuição  $\dot{V}_A/\dot{Q}$  entre 0,1 e 10.

A redução da porcentagem da área pulmonar colapsada e o aumento do número de alvéolos funcionalizados, isto é, abertos e disponíveis para as trocas gasosas, visto nos pulmões que foram recrutados à CPT e, em menor grau, nos que foram ventilados por dez minutos antes do fluxo sanguíneo ter sido restabelecido, poderia ter possibilitado que a

perfusão fosse distribuída para alvéolos mais bem ventilados com conseqüente melhora da relação  $\dot{V}_A/\dot{Q}$ , menor fração de *shunt* e maior  $\text{PaO}_2$  durante todo período de reperfusão. Isto significa dizer que os efeitos propiciados pelo recrutamento alveolar realizado no período pré-reperfusão não foram fugazes, isto é, se mantiveram após 2700 ciclos respiratórios.

O aumento da  $P_{\overline{AP}}$  nos pulmões que não foram recrutados antes da reperfusão pode ter sido a causa da falência da barreira sangue-gás com conseqüente formação de edema e lesão pulmonar I/R. A falência capilar deve ter ocorrido por alto estresse mecânico nos capilares pulmonares em função (i) da redução da tensão superficial da interface ar-líquido, (ii) da distribuição inhomogênea do fluxo sangüíneo e (iii) pela pressão de distensão alveolar.

As alterações da ultraestrutura pulmonar ocorrem imediatamente após o *flush* da circulação pulmonar com solução de Euro-Collins [33] e se perpetuam durante o período de isquemia [76]. Veldhuizen e cols. [93] mostraram que o fosfatidilglicerol e os níveis de proteína A diminuíram após 12 horas de preservação, e Klepetko e cols. [94] evidenciaram que a queda da concentração da fosfatidilcolina em pulmões preservados a 4 °C se correlacionava com o dano isquêmico dos pneumócitos II. Estas alterações são responsáveis pelo aumento da tensão superficial da interface ar-líquido dos pulmões preservados. Este aumento da tensão superficial, juntamente com o colapso alveolar, podem influenciar a integridade dos capilares pulmonares e causar lesão da microvasculatura [95]. Isto acontece porque a abolição da tensão superficial do revestimento alveolar retira o suporte da barreira sangue-gás quando os capilares são submetidos a altas pressões transmuralis [96].

A distribuição inhomogênea do fluxo sangüíneo pulmonar pode ter ocorrido em função dos baixos volumes pulmonares e/ou da vasoconstrição hipóxica, fatores responsáveis por aumentar a resistência vascular pulmonar. A vasoconstrição hipóxica é uma resposta intrínseca pulmonar que ocorre em resposta à baixa pressão alveolar de oxigênio ( $\text{PAO}_2$ ), cujo objetivo é redistribuir o sangue para áreas pulmonares bem-ventiladas [97], isto é, para áreas onde a condutância dos vasos sangüíneos é maior. Desta forma, é plausível supor que os capilares das áreas pulmonares de tamanho normal tenham recebido grande aporte de sangue e suas pressões tenham aumentado demasiadamente. Segundo West [95], há evidência de lesão do epitélio alveolar e do endotélio vascular quando os capilares pulmonares são submetidos a alta pressão transcapilar. Fu e cols. [98] demonstraram que

o aumento da pressão da artéria pulmonar acima de um valor crítico de 32,5 mmHg é suficientemente grande para produzir falência capilar por estresse mecânico. DeCampos e cols [34] sugeriram que o rápido reestabelecimento dos fluxos sanguíneo e aéreo de pulmões isquêmicos submeteriam o tecido pulmonar a enorme estresse mecânico, e que esse seria o fator desencadeante da lesão I/R.

A alta pressão utilizada para ventilar os pulmões que apresentaram, antes da reperfusão, aumento da impedância, também pode ter contribuído para a lesão microvascular [98]. Segundo a lei de Laplace, a pressão necessária para insuflar unidades alveolares, cuja tensão superficial está aumentada, precisa ser elevada. Se a pressão de distensão for diretamente transmitida para a parede dos alvéolos, haverá aumento da tensão longitudinal nos capilares [95]. Assim, o efeito combinado da redução da tensão superficial, da distribuição inhomogênea do fluxo sanguíneo e da pressão de distensão podem explicar a falência capilar e o edema alveolar visto naqueles pulmões isquêmicos que não foram tratados com nenhuma manobra de recrutamento imediatamente antes do restabelecimento da perfusão.

Os resultados da regressão logística em que as variáveis mecânicas  $\Delta P1$  (cmH<sub>2</sub>O),  $\Delta P2$  (cmH<sub>2</sub>O),  $E_{dyn}$  (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>),  $Est$  (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>) e  $R_{init}$  (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>.s) foram consideradas como independentes, e "edema pulmonar", a variável dependente, mostraram que a  $Est$  (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>) é a variável de grande importância para o desenvolvimento da lesão pulmonar I/R. Quando aumentada, seu *odds ratio* para desenvolvimento da lesão é de 4,9. Este fato ratifica a hipótese de que a impedância dos pulmões imediatamente antes do restabelecimento do fluxo sanguíneo é um fator determinante que pode induzir ou prevenir a lesão I/R. No nosso modelo, a  $Est$  (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>) explica em 54% das vezes a lesão I/R.

O recrutamento alveolar à CPT e a ventilação com volume corrente por dez minutos, ambos realizados antes do início da reperfusão, reverteram, ou pelo menos amenizaram, as alterações arquiteturais e mecânicas causadas pelos procedimentos utilizados para a preservação pulmonar.

Os resultados produzidos pela insuflação pulmonar à CPT nos comportamentos mecânico, morfométrico, de trocas gasosas e do peso líquido/peso seco foram melhores que os gerados pela ventilação com volume corrente. O recrutamento à CPT reduziu a

percentagem de área colapsada aos valores encontrados nos pulmões minimamente lesados mas, em contrapartida, hiperinsufiou aqueles alvéolos que, antes do recrutamento, tinham diâmetro normal. Estas mudanças na geometria alveolar provocadas pelo recrutamento foram responsáveis pela redução de  $\Delta P_2$  (cmH<sub>2</sub>O) e pela redução da Est (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>), o que também ocorreu, mas em menor grau, pela ventilação com volume corrente. Esta ventilação não gerou uma pressão capaz de vencer a pressão crítica de abertura das vias aéreas e dos alvéolos atelectasiados. Desta forma, a área colapsada permaneceu a mesma da vista nos pulmões submetidos à isquemia. Por outro lado, esta manobra foi capaz de aumentar a percentagem de alvéolos com diâmetro normal e, ainda, não provocou hiperinsuflação.

Além da redução da área colapsada, a insuflação pulmonar à CPT é o estímulo necessário para que haja liberação de surfactante para o espaço alveolar [29, 99]. Os vários autores que estudaram a relação entre administração de surfactante e lesão I/R [100, 101], atribuem a prevenção da lesão somente à liberação do surfactante. Contudo, os resultados da fase 3 deste estudo mostraram que a força necessária para movimentar os pulmões e a dissipação de energia envolvida neste processo diminuíram em função de alterações geométricas alveolares. DeCampos e cols. [34] demonstraram que as manobras de recrutamento alveolar empregadas antes do início da reperfusão reduziram a pressão estática na abertura das vias aéreas, indicando maior complacência pulmonar. Estes autores especularam que o recrutamento de alvéolos e a melhora precoce da complacência pulmonar eram os fatores pelos quais as intervenções mecânicas utilizadas preveniam a lesão I/R. Os dados mecânicos e morfométricos da terceira fase deste projeto confirmam esta impressão. É possível que em conjunto, a redução da área colapsada e a liberação de surfactante tenham sido os fatores responsáveis pela queda da elastância estática pulmonar. Esta queda da impedância pulmonar diminuiu o estresse mecânico nas vias aéreas e na microvasculatura dos pulmões provocado pelo restabelecimento abrupto dos fluxos aéreo e sangüíneo, o que contribuiu para (i) melhor distribuição do volume corrente e, portanto, da relação  $\dot{V}_A/\dot{Q}$ , (ii) menor resistência à passagem de sangue pela vasculatura pulmonar e (iii) menor dano estrutural causado aos pulmões (relação peso líquido/peso seco semelhante a de pulmões minimamente lesados).

A ventilação com volume corrente também é estímulo capaz de excitar os pneumócitos II para secretarem surfactante [29]. Desta forma, é plausível supor que juntamente

---

com aumento da área alveolar de tamanho normal, a diminuição da tensão superficial do revestimento alveolar, tenha protegido os vasos alveolares, como os arcos de ferro fazem nos barris, contra a lesão causada por estresse tangencial [96]. Por outro lado, a grande área de colapso não permitiu que a relação  $\dot{V}_A/\dot{Q}$  fosse melhor distribuída e, por isso, a fração de *shunt* foi maior e, a  $PaO_2$ , menor.

Em síntese, os resultados deste trabalho mostraram que o processo de preservação dos pulmões é responsável por importantes alterações da arquitetura alveolar e por piora do comportamento mecânico pulmonar, que culminam com o aumento da impedância dos pulmões. A alta elastância estática expõe o parênquima e a microvasculatura pulmonar a alto estresse mecânico produzido pelo rápido restabelecimento do fluxo sanguíneo. Os resultados também suportam a noção de que a proteção contra a lesão I/R, promovida pelas estratégias ventilatórias empregadas imediatamente antes do início da reperfusão, ocorre, em grande parte, por fatores relacionados à elastância estática pulmonar, ou seja, o bom funcionamento pulmonar pós-reperfusão se dá pela "preparação" do tecido para receber, novamente, os fluxos sanguíneo e aéreo, como demonstrado nos pulmões recrutados.



## 6 Conclusões

1. O *flush* vascular pulmonar *per se* é responsável pelo aumento da área alveolar colapsada, pelo aumento da dissipação de energia nos componentes viscoelásticos e ou nas inhomogeneidades pulmonares e pelo aumento da elastância estática pulmonar;
2. O aumento da impedância pulmonar decorrente do desarranjo arquitetural alveolar e das inhomogeneidades mecânicas pulmonares aumentam a susceptibilidade dos pulmões para desenvolverem lesão I/R;
3. Estratégias ventilatórias específicas empregadas no período pós-preservação e pré-reperusão revertem, ou pelo menos atenuam, as alterações geométricas e mecânicas pulmonares causadas durante a preservação e previnem a lesão I/R;
4. Dentre as variáveis mecânicas estudadas, a elastância estática pulmonar no período pós-preservação e pré-reperusão é a variável crítica para o desenvolvimento da lesão I/R; sua redução, imediatamente antes do fluxo sanguíneo ser restabelecido, por utilização de intervenções de cunho mecânico, implica em prevenção da lesão I/R e ótimo funcionamento pulmonar pós-reperusão.

## Referências Bibliográficas

- [1] Chaparro C, Scavuzzo M, Winton T, Keshavjee S, and Kesten S. Status of lung transplant recipients surviving beyond five years. *J Heart Lung Transplant*, 16:511–516, 1997.
- [2] Itano H, Aoe M, Ichiba S, Yamashita M, Date H, Andou A, and Shimizu N. Partial liquid ventilation for acute allograft dysfunction after canine lung transplantation. *Ann Thorac Surg*, 67:332–339, 1999.
- [3] Liu M, Transwell K, and Post M. Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*, 277:L667–L683, 1999.
- [4] Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA, Todd TR, Ginsberg RJ, Goldberg M, and DeMajo WA. Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 93:173 – 181, 1987.
- [5] Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE, and Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, 159:980–988, 1999.
- [6] Wang LS, Yoshikawa K, Miyoshi S, Nakamoto K, Hsieh CM, Yamazaki F, Cardoso PFG, Schaeffers HJG, Brito J, Keshavjee SH, Patterson GA, and Cooper JD. 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*, 98:333–342, 1989.
- [7] Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med*, 136:427–440, 2000.
- [8] Puskas JD, Cardoso PF, Mayer E, Shi S, Slutsky AS, and Patterson GA. Equivalent eighteen-hour lung preservation with low-potassium dextran or euro-collins solution after prostaglandin e1 infusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 104:83 – 89, 1992.
- [9] Keshavjee SH, Yamazaki F, Cardoso PFG, McRitchie DI, Patterson GA, and Cooper JA. A method for safe twelve-hour pulmonary preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 98:529–534, 1989.
- [10] Strüber M, Wilhelmi M, Harringer W, Niedermeyer J, Anssar M, Künsebeck A, Schmitto JD, and Haverich A. Flush perfusion with low potassium dextran solution

- improves early graft function in clinical lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg*, 19:190–194, 2001.
- [11] Strüber M, Hohlfeld JM, Fraund S, Kim P, Warnecke G, and Haverich A. Low-potassium dextran solution ameliorates reperfusion injury of the lung and protects surfactant function. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 120:566–572, 2000.
- [12] Al Medhi AB, Shuman H, and Fisher AB. Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am J Physiol*, 272:L294–L300, 1997.
- [13] Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med*, 136:247–440, 2000.
- [14] Koyama I, Toung TJK, Rogers MC, Gurtner GH, and Traystman RJ. O<sub>2</sub> radicals mediate reperfusion lung injury in ischemic oxygen-ventilated canine pulmonary lobe. *J Appl Physiol*, 63:111–115, 1987.
- [15] Clavien PA, Harvey PR, and Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: an overview and synthesis of current studies. *Transplantation*, 5:957–978, 1992.
- [16] Huang YT, Ghio AJ, Nozik-Grayck E, and Piantadosi CA. Vascular release of nonheme iron in perfused rabbit lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 280:L474–L481, 2001.
- [17] Serrick C, Adoumie R, Giraid A, and Shennib H. The early release of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma after ischemia reperfusion in the lung allograft. *Transplantation*, 58:1158–1162, 1994.
- [18] Khimenko PL, Bagby GJ, Fuseler J, and Taylor AE. Tumor necrosis factor-alpha in ischemic and reperfusion injury in rat lungs. *J Appl Physiol*, 85:2005–2011, 1998.
- [19] de Perrot M, Liu M, Wadell TK, and Keshavjee S. Ischemia-reperfusion induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 167:490–511, 2003.
- [20] DeCampos KN, Keshavjee S, Liu M, and Slutsky AS. Prevention of rapid reperfusion-induced lung injury with prostaglandin e1 during the initial period of reperfusion. *J Heart Lung Transplant*, 17:1121–1128, 1998.

- [21] Fukuse T, Hirata T, Nakamura T, Kawashima M, Hitomi S, and Wada H. Influence of deflated and anaerobic conditions during cold storage on rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med*, 160:621–627, 1999.
- [22] Haniuda M, Hasegawa S, Shirashi T, Dresler CM, Cooper JD, and Patterson GA. Effects of inflation volume during lung preservation on pulmonary capillary permeability. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 112:85–93, 1996.
- [23] Pierre AF, DeCampos KN, Liu M, Edwards V, Cutz E, Slutsky AS, and Keshavjee SH. Rapid reperfusion causes stress failure in ischemic rat lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 116:932–942, 1998.
- [24] Halldorsson A, Kronon M, Allen BS, Rahman S, Wang T, Layland M, and Sidle D. Controlled reperfusion prevents pulmonary injury after 24 hours of lung preservation. *Ann Thoracic Surg*, 66:877–885, 1998.
- [25] Halldorsson A, Kronon M, Allen BS, Bolling KS, Wang T, Rahman S, and Feinberg H. Controlled reperfusion after lung ischemia: implications for improved function after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 115:415–425, 1998.
- [26] Schütte H, Hermle G, Seeger W, and Grimminger F. Vascular distension and continued ventilation are protective in lung ischemia/reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med*, 157:171–177, 1998.
- [27] Bishop JE, Mitchell JJ, Absher PM, Baldor L, Geller HA, Woodcock-Mitchell J, Hamblim J, Vacek P, and Low RB. Cyclic mechanical deformation stimulates human lung fibroblast proliferation and autocrine growth factor activity. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 3:126–133, 1993.
- [28] Leslie CC, McCormick-Shannon K, Mason RJ, and Shannon JM. Proliferation of rat alveolar epithelial cells in low density primary culture. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 9:64–72, 1993.
- [29] Hildebran JN, Goerke J, and Clements JA. Surfactant release in excised rat lung is stimulated by air inflation. *J Appl Physiol*, 51:905–910, 1981.

- [30] Dudek SM and Garcia JGN. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*, 91:1487–1500, 2001.
- [31] Tremblay L, Valenza F, Ribeiro S, Li J, and Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA in an isolated rat lung model. *J Clin Invest*, 99:944–952, 1997.
- [32] Dreyfuss D and Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med*, 157:294–323, 1998.
- [33] Andrade RS, Solien EE, Wangenstein OD, Tsai MY, Kshetry VR, and Bolman RM 3rd. Surfactant dysfunction in lung preservation. *Transplantation*, 60:536–541, 1995.
- [34] DeCampos KN, Keshavjee S, Slutsky AS, and Liu M. Alveolar recruitment prevents rapid-reperfusion-induced injury of lung transplants. *J Heart Lung Transplant*, 18:1096–1102, 1999.
- [35] Srinivasan HB, Vogel SM, Vidyasagar D, and Malik AB. Protective effect of lung inflation in reperfusion-induced lung microvascular injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278:H951–H957, 2000.
- [36] Sakuma T, Takashi K, Kajikawa O, Martin TR, Albertine KH, and Matthay MA. Ischemia-reperfusion lung injury in rabbits: mechanisms of injury and protection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 276:L137–145, 1999.
- [37] Stevens GH, Sanchez MM, and Chappell GL. Enhancement of lung preservation by prevention of lung collapse. *J Surg Res*, 4:400–405, 1973.
- [38] Hamvas A, Park CK, Palazzo R, Liptay M, Cooper J, and Schuster DP. Modifying pulmonary ischemia-reperfusion injury by altering ventilatory strategies during ischemia. *J Appl Physiol*, 73:2112–2119, 1992.
- [39] Koletsis E, Chatzimichalis A, Fotopoulos V, Kokkinis K, Papadimitriou E, Tiniakos D, Marinos E, Bellenis I, and Dougenis D. Donor lung pretreatment with surfactant in experimental transplantation preserves graft hemodynamics and alveolar morphology. *Exp Biol Med*, 228:540–545, 2003.

- [40] Veith FJ, Sinha SB, Graves JS, Boley SJ, and Dougherty JC. Ischemic tolerance of the lung: the effect of ventilation and inflation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 61:804–810, 1971.
- [41] DeCampos KN, Keshavjee S, Liu M, and Slutsky AS. Optimal inflation volume for hypothermic preservation of rat lungs. *J Heart Lung Transplant*, 17:599–607, 1998.
- [42] Weder W, Harper B, Shimokawa S, Miyoshi S, Date H, Schreinmakers H, Egan T, and Cooper JD. Influence of intraalveolar oxygen concentration on lung preservation in a rabbit model. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 101:1037–1043, 1991.
- [43] Kawaguchi AT, Kawashima Y, Mizuta T, Ishibashi-Ueda H, Kanosue K, Shirakura R, and Matsuda H. Single lung transplantation in rats with fatal pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 104:825–829, 1992.
- [44] Halldorsson AO, Kronon MT, Allen BS, Rahman S, and Wang T. Lowering reperfusion pressure reduces the injury after pulmonary ischemia. *Ann Thorac Surg*, 69:198–203, 2000.
- [45] DeCampos KN, Keshavjee SH, Tremblay L, Yamashiro T, and Slutsky AS. Use of a hypoxic lung as a deoxygenator to provide extended assessment of pulmonary function in rats. *J Appl Physiol*, 80:1835–1840, 1996.
- [46] Wostmann B.S, Kardoss E.B, and Knight P.L. Jr. Cecal enlargement, cardiac output and oxygen consumption in germfree rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 128:137–141, 1968.
- [47] McIlroy M.B. *Handbook of Physiology*, chapter Pulmonary shunts, pages 1519–1524. The American Thoracic Society, 1965.
- [48] Otis A, Fenn W, and Rahn H. The mechanics of breathing in man. *J Appl Physiol*, 2:592–607, 1950.
- [49] Guttmann J, Eberhard L, Wolff G, Bertschmann W, Zeravik J, and Adolph M. Maneuver-free determination of compliance and resistance in ventilated ards patients. *Chest*, 102:1235–1242, 1992.
- [50] Wald A, Jason D, Murphy T, and Mazzia V. A computer system for respiratory parameters. *Comput Biomed Res*, 2:411–429, 1969.

- [51] Uhl R and Lewis F. Digital computer calculation of human pulmonary mechanics using a least squares fit technique. *Comput Biomed Res*, 7:489–495, 1974.
- [52] Lunacangelo U, Barnabé F, and Blanch L. Respiratory mechanics derived from signals in the ventilator circuit. *Respir Care*, 50:55–65, 2005.
- [53] Volta C, Marangoni E, Alvisi V, Capuzzo M, Ragazzi R, Pavanelli L, and Alvisi R. Respiratory mechanics by least squares fitting in mechanically ventilated patients: application on flow-limited copd patients. *Intensive Care Med*, 28:48–52, 2002.
- [54] Zin WA. *Basics of respiratory mechanics and artificial ventilation*, chapter Principles of measurement of respiratory mechanics, pages 3–8. Springer, 1998.
- [55] Evora P.R.B and Ribeiro P.J.F. *Monitorização hemodinâmica e suporte cardiocirculatório do paciente crítico*, chapter Medida da pressão arterial, pages 83–90. Atheneu, 1996.
- [56] Parker C.J and Townsley M.I. Evaluation of lung injury in rats and mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286:L231–246, 2004.
- [57] Silva M. F, Zin W.A, and Saldiva P.H.N. Airspace configuration at different transpulmonary pressure in normal and in paraquat-induced lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 158:1230–1234, 1998.
- [58] Gundersen HJ. Stereology – or how figures for spatial shape and content are obtained by observation of structures in sections. *Microsc Acta*, 83:409 – 426, 1980.
- [59] Mortola JP and Noworaj A. Two side-arm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. *J Appl Physiol*, 55:250 – 253, 1983.
- [60] Kleinbaum F.G, Kupper L.L, Muller K.E, and Nizam A. *Applied regression analysis and other multivariable methods*. Duxbury Press, 3rd edition, 1998.
- [61] Fehrenbach A, Ochs M, Warnecke T, Wahlers T, Wittwer T, Schmiedl A, Elki S, Meyer D, Richter J, and Fehrenbach H. Beneficial effect of lung preservation is related to ultrastructural integrity of tubular myelin after experimental ischemia and reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med*, 161:2058–2065, 2000.

- [62] Bates J.H.T, Brown K.A, and Kochi T. Respiratory mechanics in the normal dog determined by expiratory flow interruption. *J Appl Physiol*, 67:2276–2285, 1989.
- [63] Mount L.E. The ventilation flow resistance and compliance of rat lungs. *J Appl Physiol*, 127:157–167, 1955.
- [64] Sharp JT, Johnson N, Goldberg NB, and Van Lith P. Hysteresis and stress adaptation in the human respiratory system. *J Appl Physiol*, 23:487–497, 1967.
- [65] Bates J.H.T, Rossi A, and Milic-Emili J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J Appl Physiol*, 58:1840–1848, 1985.
- [66] Kochi T, Okubo S, Zin WA, and Milic-Emili J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. *J Appl Physiol*, 64:441–450, 1988.
- [67] Kochi T, Okubo S, Zin WA, and Milic-Emili J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects of flow and volume. *J Appl Physiol*, 64:2636–2646, 1988.
- [68] D'Angelo E, Calderini E, Torri G, Robatto FM, Bono D, and Milic-Emili J. Respiratory mechanics in anesthetized paralyzed humans: effects of flow, volume and time. *J Appl Physiol*, 67:2556–2564, 1989.
- [69] Aarseth P, Bjertnaes L, and Karlsen J. Changes in blood volume and extravascular content in isolated perfused rat lung during ventilation hypoxia. *Acta Physiol Scand*, 109:61–67, 1980.
- [70] Allison RC, Kyle J, Adkins WK, Prasad VR, McCord JM, and Taylor AE. Effect of ischemia reperfusion or hypoxia reoxygenation on lung vascular permeability and resistance. *J Appl Physiol*, 69:597–603, 1990.
- [71] Compeau CG, Ma J, DeCampos KN, Wadell TK, Brisseau GF, Slutsky AS, and Rotsstein OD. In situ ischemia and hypoxia enhance alveolar macrophage tissue factor expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 11:446–455, 1994.
- [72] Slutsky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest*, 116:9S–15S, 1999.



- [73] Dreyfuss D, Basset G, Soler P, and Saumon G. Intermittent positive-pressure hyper-ventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats. *Am Rev Respir Dis*, 132:880–884, 1985.
- [74] Dreyfuss D, , Soler P, Basset G, and Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. respective effects of high airway pressure, high tidal volume and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*, 137:1159–1164, 1988.
- [75] Peták F, Babik B, Hantos Z, Morel DR, Pache J, Biton C, Suki B, and Habre W. Impact of microvascular circulation on peripheral lung stability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287:L879–889, 2004.
- [76] Andrade RS, Wangenstein OD, Jo JK, Tsai MY, and Bolman RM 3rd. Effect of hypothermic pulmonary artery flushing on capillary filtration coefficient. *Transplantation*, 70:267–271, 2000.
- [77] DeCampos KN, Waddell TK, Slutsky AS, Post M, and Patterson GA. Assessment of postpreservation rat lung function using a new model for extended venous reperfusion. *J Appl Physiol*, 75:1890–1896, 1993.
- [78] Ochs M, Fehrenbach H, Nenadic I, Bando T, Fehrenbach A, Schepelmann D, Albes JM, Wahlers T, and Richter J. Preservation of intraalveolar surfactant in a rat lung ischemia/reperfusion model. *Eur Respir J*, 15:526–531, 2000.
- [79] Auler Jr OC, Zin WA, Caldeira MPR, Cardoso WV, and Saldiva PHN. Pre and postsoperative inspiratory mechanics in ischemic and valvular heart disease. *Chest*, 92:984–990, 1987.
- [80] Peták F, Habre W, Hantos Z, Sly PD, and Morel DR. Effects of pulmonary vascular pressures and flow on airway and parenchymal mechanics in isolated rat lungs. *J Appl Physiol*, 92:169–178, 2002.
- [81] Freezer NJ, Lanteri CJ, and Sly PD. The effect of pulmonary blood flow on measurement of respiratory mechanics using the interrupter technique. *J Appl Physiol*, 74:1083–1088, 1993.

- [82] Ishii M, Matsumoto N, Fukuyi T, Hida W, Ichinose M, and Takashima T. Effects of hemodynamic edema formation with developing pulmonary edema in dogs. *J Appl Physiol*, 59:1578–1584, 1985.
- [83] Weibel ER, Sapoval B, and Filoche M. Design of peripheral airways for efficient gas exchange. *Respir Physiol Neurobiol*, 148:3–21, 2005.
- [84] Rodriguez M, Bur S, Favre A, and Weibel ER. Pulmonary acinus: geometry and morphometry of the peripheral airway system in rat and rabbit. *Am J Anat*, 180:143–155, 1987.
- [85] Lubica H. Pathologic lung function in children and adolescents with congenital heart defects. *Pediatr Cardiol*, 17:314–315, 1996.
- [86] Colebatch HJH, Ng CKY, Berend N, and Maccioni FJ. Effect of the chest wall and blood volume on pulmonary distensibility. *J Appl Physiol*, 72:186–193, 1992.
- [87] Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, and Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol*, 72:168–178, 1992.
- [88] Ikeyama K, Sakai H, Omasa M, Nakamura T, Hamakawa H, Fujinaga T, Fukuse T, and Wada H. Effects of cold preservation on the lung mechanical properties in rats. *Eur Surg Res*, 37:85–91, 2005.
- [89] Ralph DD, Robertson HT, Weaver LJ, Hlastala MP, Carrico CJ, and Hudson LD. Distribution of ventilation and perfusion during positive end-expiratory pressure in the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 131:54–60, 1985.
- [90] Hermle G, Schütte H, Walmrath D, Geiger K, Seeger W, and Grimminger F. Ventilation-perfusion mismatch after lung ischemia-reperfusion. protective effect of nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*, 160:1179–1187, 1999.
- [91] Wagner PD, Saltzman HA, and West JB. Measurement of continuous distributions of ventilation-perfusion ratios: theory. *J Appl Physiol*, 36:588–599, 1974.

- [92] Wagner PD, Laravuso RB, Uhl RR, and West JB. Continuous distributions of ventilation-perfusion ratios in normal subjects breathing air and 100% oxygen. *J Clin Invest*, 54:54–68, 1974.
- [93] Veldhuizen RA, Lee J, Sandler D, Hull W, Whitsett JA, Lewis J, Possmayer F, and Novick RJ. Alterations in pulmonary surfactant composition and activity after experimental lung transplantation. *Am Rev Respir Dis*, 148:208–215, 1993.
- [94] Klepetko W, Lohninger A, Wissner W, Mueller MR, Khunl-Brady G, Windisch A, Eckesberger F, and Wolner E. Pulmonary surfactant in bronchoalveolar lavage after canine lung transplantation: effect of l-carnitine application. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 99:1048–1058, 1990.
- [95] West JB. Invited review: pulmonary capillary stress failure. *J Appl Physiol*, 89:2483–2489, 2000.
- [96] Namba Y, Kurdak SS, Fu Z, Mathieu-Costello O, and West JB. Effect of reducing alveolar surface tension on stress failure in pulmonary capillaries. *J Appl Physiol*, 79:2114–2121, 1995.
- [97] Moudgil R, Michelakis ED, and Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol*, 98:390–403, 2005.
- [98] Fu Z, Costello LM, Tsukimoto K, Prediletto R, Elliot AR, Mathieu-Costello O, and West JB. High lung volume increases stress failure in pulmonary capillaries. *J Appl Physiol*, 73:123–133, 1992.
- [99] Wirtz HR and Dobbs LG. Calcium mobilization and exocytosis after a one mechanical stretch of lung epithelial cells. *Science*, 250:1266–1269, 1990.
- [100] Erasmus ME, Petersen AH, Hofstede GJH, Haagsman HP, Bambang Oetomo S, and Prop J. Surfactant treatment before reperfusion improves the immediate function of lung transplants in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 153:665–670, 1996.

- [101] Erasmus ME, Hofstede GJH, Petersen AH, , Haagsman HP, Bambang Oetomo S, and Prop J. Effects of early surfactant treatment persisting for one week after lung transplantation in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 156:567–572, 1997.