

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS**

**TESE DE DOUTORADO**

**CONTROLE DO ESCAPE DE AR EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
AEROSTASIA PULMONAR PELA APLICAÇÃO DE ENXERTO  
AUTÓLOGO DE GORDURA LIVRE**

**JOSÉ CARLOS FELICETTI**

**Orientadores: Prof. Dr. Cristiano Feijó Andrade  
Prof. Dr. José da Silva Moreira**

**Porto Alegre**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS**

**TESE DE DOUTORADO**

**CONTROLE DO ESCAPE DE AR EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
AEROSTASIA PULMONAR PELA APLICAÇÃO DE ENXERTO  
AUTÓLOGO DE GORDURA LIVRE**

**JOSÉ CARLOS FELICETTI**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Pneumológicas, da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do grau de Doutor**

**Orientadores: Prof. Dr. Cristiano Feijó Andrade  
Prof. Dr. José da Silva Moreira**

**Porto Alegre**

**2011**

## CIP - Catalogação na Publicação

Felicetti, José Carlos

CONTROLE DO ESCAPE DE AR EM MODELO EXPERIMENTAL  
DE AEROSTASIA PULMONAR PELA APLICAÇÃO DE ENXERTO  
AUTÓLOGO DE GORDURA LIVRE / José Carlos Felicetti. --  
2011.

82 f.

Orientador: Cristiano Feijó Andrade.

Coorientador: José da Silva Moreira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BRRS,  
2011.

1. Aerostasia Pulmonar. 2. Gordura Livre Autóloga.  
3. Escape de Ar. I. Andrade, Cristiano Feijó,  
orient. II. Moreira, José da Silva, coorient. III.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

## DEDICATÓRIA

Em memória de meus pais Leonello e Beatriz Maria. Tenho saudade deles.

Aos meus filhos Ricardo Augusto e Fernanda Beatriz. Que sejam felizes em seus caminhos.

À Sonia, minha querida companheira, com quem aprendi as maiores lições de caráter e afeto. Sou privilegiado com teu convívio.

À minha netinha Beatriz, que trouxe a alegria da infância e a doçura de sua presença.

## AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. José J. Peixoto Camargo, pelo privilégio de um convívio longo e fraterno com uma mente inteligente, inovadora e incansável. Em um dos momentos desse convívio surgiu a ideia desse trabalho.

- Ao Dr. José Antonio L. Figueiredo Pinto, por ser o grande cirurgião a quem admiro, pelo que me ensinou e pela figura humana e carismática.

- Ao Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso, pela amizade que nos uniu por mais de uma década de trabalho árduo. Admiro sua provocação intelectual. Ele desenvolveu o projeto desse trabalho.

- Ao Artur Antônio Rodrigues Burlamaque, pela amizade e trabalho incansável nestes quase quarenta anos de convívio.

- Ao Dr. José da Silva Moreira, meu orientador, meu amigo paciente, pela persistência e empenho para que esse trabalho fosse concluído.

- Ao Dr. Cristiano Feijó Andrade, meu orientador pelo apoio em todo desenvolvimento do projeto e parceria na finalização desse longo trabalho.

- Ao Dr. Tiago Noguchi Machuca, pela sua amizade fraterna num dos momentos mais difíceis da minha vida. Com sua paciência oriental, motivou-me e ajudou a não desistir desse projeto de vida. Obrigado amigo.

- Aos Drs. Pablo G. Sanchez e Eduardo Generosi, pelo auxílio no desenvolvimento e finalização desse trabalho.

- Ao Dr Rodrigo Bello pela amizade e capacidade técnica na obtenção de todas as imagens radiológicas.

- Aos então acadêmicos Eduardo Fontena, Luiz Felipe Forgiarini e Gustavo Grün, pela ajuda na execução técnica do projeto.

- À Enfermeira Marta Regina Dotto, responsável pela Unidade de Experimentação animal do HCPA, pela sua dedicação e empenho.

- Às minhas secretárias Naira e Glória pela ajuda de sempre.

- Ao Marco Aurélio Silva e ao Sérgio Silveira, pela disponibilidade constante.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	II
AGRADECIMENTOS.....	III
SUMÁRIO.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2.REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
2.1. O problema do Escape de Ar, após Ressecções Pulmonares Parciais.....	7
2.2. Fatores de Risco para Escape de Ar Prolongado.....	7
2.3. Tratamento do Escape de Ar Prolongado.....	9
2.4. Escape de Ar Prolongado em Ressecções Pulmonares Parciais.....	15
2.5. Estudos Locais Referentes a Escape de Ar Prolongado.....	16
2.6. Estudos Experimentais de Gordura Como Selante.....	17
2.7. Estudos Clínicos com Aplicação de Gordura.....	18
2.8. Utilização de Gordura Livre Como Fonte de Células Tronco.....	20
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>23</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>5. METODOLOGIA.....</b>	<b>25</b>
5.1. Estudo Piloto.....	25

5.2. Indução Experimental do Enfisema Pulmonar.....	28
5.3. Randomização: Pulmões Normais ou com Enfisema pulmonar .....	29
5.4. Morfometria para Contagem dos Septos Inter-alveolares.....	30
5.5. Análise da Vascularização do Enxerto .....	31
5.6. Análise Imuno-histoquímica do Enxerto de Gordura Livre.....	31
5.7. Análise Estatística.....	32
5.8. Ética em Pesquisa.....	32
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
6.1. Mortalidade na Série Experimental .....	33
6.2. Integração Tecidual do Enxerto de Gordura Livre.....	33
6.3. Contagem do Número de Septos Inter-alveolares.....	34
6.4. Vascularização e Perfusão do Enxerto de Gordura Livre Autóloga.....	35
6.4.1. Contagem do número de vasos no enxerto de gordura livre .....	35
6.4.2. Perfusão com Tinta da China.....	36
6.5. Análises Imuno-histoquímicas no enxerto de gordura livre .....	37
6.5.1. Análise Imuno-histoquímica para Fator VIII.....	37
6.5.2. Imuno-histoquímica para VEGF.....	38
6.5.3. Imuno-histoquímica para Apoptose (caspase 3).....	40
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>49</b>
<b>10. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>
<b>11. ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>56</b>



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CEC = Circulação Extra Corpórea

CVF = Capacidade Vital Forçada

DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EA = Escape de Ar

FA = Fuga Aérea

HE = Hematoxilina e Eosina

FCH = Fator de Crescimento de Hepatócitos

IMC = Índice de Massa Corporal

VEF1 = Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo

PEEP= Pressão Positiva Expiratória Final

PTFE = Politetrafluoretileno

SARA = Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto

## **ABREVIATURAS (siglas em inglês)**

*NETT = National Emphysema Treatment Trial*

*PEEP = Positive End Expiratory Pressure*

*PIXEL = Picture Element*

*VEGF =Vascular Endothelial Growth Factor*

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Paciente masculino de 61 anos submetido à lobectomia inferior esquerda por carcinoma brônquico.	6
Figura 2. A: Intubação orotraqueal B: Laparotomia ( $\pm$ 1 cm) no terço inferior do abdome C: Gordura do Epíplon.	26
Figura 3. Gordura preparada em seringa de 1 ml para enxertia no pulmão.	27
Figura 4. A: Rato em decúbito lateral esquerdo; B: Pulmão após trauma penetrante periférico e teste da fuga aérea; C: Injeção da gordura livre autóloga obtida do epíplon na base pulmonar; D: Gordura na base do pulmão com aerostasia completa.	28
Figura 5. A: espécime fixado em formol, com enxerto de gordura em parênquima pulmonar	34
Figura 6. Imagem representativa da morfometria realizada para contagem de septos interalveolares.	35
Figura 7. Contagem de septos em pulmão normal e em pulmão com enfisema..	35
Figura 8. Amostras representativas em H&E de pulmões de ratos com enfisema, demonstrando a presença de vasos corados com Tinta da China em enxertos de gordura livre em diferentes períodos de observação.	36
Figura 9. Análise da densidade vascular através da porcentagem de <i>pixels</i> corados pela imuno-histoquímica para o fator VIII..	37
Figura 10. Análise Imuno-histoquímica para Fator VIII nos pulmões com enfisema e enxerto de gordura livre.	38
Figura 11. Análise da porcentagem de <i>pixels</i> corados pela imuno-histoquímica para VEGF.	39
Figura 12. Análise imuno-histoquímica do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) nos pulmões submetidos ao enfisema com o enxerto de gordura.	40
Figura 13. Análise da porcentagem de <i>pixels</i> corados pela imuno-histoquímica para caspase-3.	41
Figura 14. Análise Imuno-histoquímica da Caspase-3 nos pulmões submetidos ao enfisema com o enxerto de gordura.	42
Figura 15. Análise gráfica comparativa dos marcadores imuno-histoquímicos nos diferentes tempos de observação (grupo enfisema).	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela I.	Expressão do Fator VIII por análise imuno-histoquímica.	37
Tabela II.	Análise da expressão do VEGF por imuno-histoquímica.	39
Tabela III.	Média de <i>pixels</i> corados para caspase-3 em ratos com e sem enfisema nos diferentes períodos de avaliação.	41

## RESUMO

O escape de ar persistente é a complicação mais frequente após ressecções pulmonares, resultando no aumento da morbimortalidade no pós-operatório. Objetivo: Avaliar a viabilidade, integração e eficácia do enxerto de gordura livre peritoneal como método de controle de escape de ar em ratos com pulmões normais e enfisematosos. Métodos: sessenta ratos Wistar foram divididos em dois grupos: enfisema (n=30) e pulmão normal (n=30). O escape de ar pulmonar foi obtido por perfuração direta no lobo inferior direito. Injeção intrapulmonar de enxerto de gordura livre autóloga peritoneal foi utilizada para aerostasia. Os ratos de cada grupo foram divididos aleatoriamente em subgrupos (n=6) de 7, 14, 21, 30 e 60 dias. Depois do sacrifício, os pulmões foram removidos para análise histológica, morfometria, identificação e contagem de vasos, imuno-histoquímica para caspase 3, VEGF e Fator VIII. Resultados: houve integração tecidual do enxerto de gordura livre em todos os animais de ambos os grupos e em todos períodos de tempo. Vasos corados com Tinta da China no interior do enxerto de gordura estavam presentes em todos períodos em ambos grupos. A expressão de VEGF foi significativamente mais alta em todos os períodos no grupo do enfisema em comparação aos pulmões normais ( $p<0.001$ ). Houve um significativo aumento na expressão da caspase 3 no grupo do enfisema aos 30 e 60 dias ( $p<0.001$ ). O Fator VIII mostrou um aumento significativo ( $p<0.001$ ) nos pulmões enfisematosos aos 30 e 60 dias. Conclusão: Este estudo demonstrou que o uso de enxerto de gordura livre peritoneal é capaz de controlar o escape de ar tanto em pulmões de ratos normais como naqueles com enfisema, e a viabilidade persiste por, pelo menos, 60 dias após seu implante.

## **SUMMARY**

*Persistent pulmonary air leak is the most frequent complication after lung resection resulting in an increase of postoperative morbimortality. Objective: Evaluate the viability, integration and efficacy of free peritoneal fat graft as a method for air leak control into normal and emphysematous rat lungs. Methods: Sixty Wistar rats were divided into two groups: emphysema (n=30) and normal lung (n=30). Pulmonary air leak was produced by direct puncture of the right lower lobe. Intra pulmonary injection of autologous free peritoneal fat graft was used for aerostasis. The rats from each group were randomly divided into subgroups (n=6) of 7, 14, 21, 30 and 60 days. After sacrifice, lungs were removed for histological analysis, morphometry, vessel identification and counting, immunohistochemistry for Caspase 3, VEGF and Factor VIII. Results: There was tissue integration of the free fat grafts in all animals in both groups at all time periods. Vessels stained with India ink inside the fat grafts were present at all periods in both groups. VEGF expression was significantly higher in all periods in the emphysema group in comparison to normal lungs ( $p<0.001$ ). There was a significant increase in caspase 3 expression in the emphysema group at 30 and 60 days ( $p<0.001$ ). Factor VIII showed a significant increase ( $p<0.001$ ) at 30 and 60 days in emphysematous lungs. Conclusion: This study demonstrated that the use of free peritoneal fat graft controls air leak in normal and emphysematous rat lungs with persisting graft viability for at least 60 days after implantation.*

## 1. INTRODUÇÃO

Nos pacientes submetidos a ressecções pulmonares parciais frequentemente ocorre escape de ar de origem alveolar proveniente das áreas cruentas da dissecação cirúrgica ou das suturas, tanto manuais quanto naquelas em que se utilizam os grampeadores mecânicos. A persistência dessa fuga de ar impõe a necessidade da manutenção de drenos pleurais no pós-operatório por períodos indefinidos, até que o assim chamado escape de ar pelos drenos pleurais cesse, e, então, esses drenos possam ser retirados. As implicações clínicas de co-morbidades e hospitalização crescem à medida que o tempo de drenagem aumenta.

O escape de ar (EA), ou fuga aérea (FA), é muito frequente após cirurgia com ressecção pulmonar (Brunelli A, 2010; Murthy SC, 2006). Pode ocorrer em cerca de 20% a 80% dos pacientes submetidos a ressecções pulmonares convencionais, e em até 90% daqueles pacientes considerados de alto risco, como por exemplo, os enfisematosos submetidos a tratamento cirúrgico para redução do volume pulmonar (DeCamp MM et al., 2006). A persistência do escape de ar após a cirurgia pulmonar, observada no sistema de drenagem do tórax, predispõe à contaminação da cavidade pleural, favorecendo a evolução para empiema. A concomitância desta ocorrência com infecções do trato respiratório também contribui para o retardamento e o agravamento na resolução do quadro clínico. Não raro são constatadas síndromes com componente infeccioso sistêmico, como por exemplo, a Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA). A persistência do EA prolongado reflete-se no aumento significativo da morbidade e na mortalidade desses pacientes oriundos da cirurgia pulmonar. Por outro lado, as indesejadas internações hospitalares prolongadas, além do comprometimento clínico, resultam em considerável aumento nos custos da internação

hospitalar, tanto para o paciente, quanto para a instituição que o acolhe (Lackey A & Mitchell JD, 2010).

Algumas doenças estão diretamente relacionadas com a presença de escape de ar, ou fuga aérea persistente, no período que se segue à cirurgia das ressecções pulmonares. A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) reúne condições clínicas para que o escape de ar aconteça (Brunelli et al., 2004; Merritt RE et al., 2010), incluindo as alterações patológicas estruturais no parênquima pulmonar, com consequente aumento da resistência das vias aéreas e perda da elasticidade por alteração tecidual. O escape de ar prolongado, por definição clínica, refere-se à persistência da saída de ar observada no sistema de drenagem de tórax por mais de sete dias após a operação (Brunelli A et al., 2004). Outros fatores também contribuem para essa ocorrência pós-operatória, como, por exemplo, as condições anatômicas representadas por cissuras pulmonares incompletas e a cirurgia em lobos pulmonares superiores. Doenças como diabetes, vasculopatias, doença granulomatosa, câncer de pulmão e desnutrição também podem estar envolvidas na ocorrência do escape de ar prolongado quando esses pacientes são submetidos ao tratamento cirúrgico por ressecções pulmonares parciais (Brunelli et al., 2010).

Com os recentes avanços da cirurgia torácica e da terapia intensiva, pacientes portadores de enfisema pulmonar com comprometimento moderado ou grave dos pulmões (De Camp MM et al., 2006) podem ser considerados candidatos a ressecções pulmonares, tanto para tratamento do próprio enfisema quanto de outras doenças, como por exemplo, o carcinoma brônquico. Em trabalho local recente foi observado que um dos fatores prognósticos determinantes de morbidade e mortalidade, após lobectomias pulmonares para tratamento de carcinoma brônquico, foi o escape de ar prolongado por mais de sete dias com retardo na retirada dos drenos pleurais (Sanchez PG et al., 2006;

Cerfolio RJ & Bryant AS, 2010). Em geral, os pacientes com pobre função pulmonar e os desnutridos costumam ser os mais acometidos por esta complicação (Brunelli A et al., 2010). Em geral, os pacientes com pobre função pulmonar e os desnutridos costumam ser os mais acometidos por esta complicação (Brunelli A et al., 2010).

O risco para que o escape de ar persista após a cirurgia depende de conhecimentos específicos inerentes à técnica cirúrgica e, também, da habilidade do cirurgião em observar os princípios básicos para uma aerostasia aceitável no intra-operatório. A aerostasia meticulosa, especificamente nas cissuras interlobares incompletas, evita expor superfícies cruentas que possam representar um potencial foco para escape de ar persistente. Algumas particularidades técnicas têm sido recomendadas para controle aerostático (Balsara KR et al., 2010; Merrit et al., 2010), incluindo suturas mecânicas associadas ou não a colas biológicas, pericárdio bovino ou material sintético não biológico (Rice TW & Blackstone EH, 2010). Menos frequentemente, está sendo utilizado material autólogo, como, por exemplo, sangue injetado na linha de sutura (Droghetti et al., 2006) ou gordura pericárdica pediculada (Yoshimura M et al. 2002). As suturas pulmonares com fio absorvível continuam sendo a opção habitual para aerostasia após as ressecções pulmonares parciais, seguidas pelas suturas mecânicas, as quais ainda implicam em maior custo em nosso meio. Ainda assim, ambas oferecem graus de dificuldades peculiares na obtenção de aerostasia definitiva durante o procedimento cirúrgico.

A utilização de gordura livre autóloga tem sido relatada por especialidades como a neurocirurgia no tratamento de fístulas liquóricas (Landeiro JA et al., 2004), na cirurgia de cabeça e pescoço para tratamento de paralisia de corda vocal (Zaretsky LS et al., 1995) e na cirurgia pulmonar com finalidade aerostática (Matsumoto I et al., 2005). A gordura livre autóloga tem sido ainda referida como fonte de células tronco



para o reparo de vias metabólicas anormais em pacientes com síndromes genéticas e na cirurgia plástica reconstrutora (Tran TT & Kahn CR, 2010).

Uma variável constantemente observada nessas aplicações de gordura livre é a diminuição progressiva das dimensões do enxerto (Coleman SR, 1995), provavelmente relacionada à apoptose das células de gordura. Essa constatação talvez explique a razão por que cirurgiões torácicos preferem retalhos pediculados de gordura, limitando a utilização de gordura livre autóloga – teoricamente – pelo temor da necrose e suas consequências. Nishimura e colaboradores procuraram explicar este fenômeno com um experimento, colocando gordura livre no dorso de ratos (Nashimura et al., 2000). Concluíram que a gordura assim empregada mantinha sua viabilidade por osmose nos primeiros quatro dias. O estímulo hipoxêmico mantido nos dias subsequentes favorecia a liberação de fator de crescimento endotelial, estimulando a angiogênese que revasculariza o enxerto. Verificaram, também, que este estímulo para o crescimento endotelial diminuía seu efeito após trinta dias, conseqüentemente, induzindo à redução do tamanho do enxerto por mecanismos mediados por apoptose.

Nossa observação clínica com aplicação de gordura livre no intra-operatório de cirurgias de ressecções pulmonares parciais e nos transplantados de pulmão tem mostrado resultados encorajadores, revelando-se eficaz no controle do escape de ar (Figura 1). O difícil controle do escape de ar prolongado em pacientes transplantados de pulmão e re-operados para tratamento desta intercorrência advinda do pulmão enxertado foi resolvido com a utilização de gordura livre autóloga, obtida na região pré-pericárdica, inserida e suturada na fístula de origem parenquimatosa pulmonar. Em alguns casos de pacientes transplantados, e em outros enfisematosos re-operados, o resultado aerostático foi imediato, permitindo a remoção dos drenos pleurais em períodos muito curtos. Observações em re-operações nesse mesmo grupo de pacientes –

em quem fora utilizada gordura livre e que tiveram nova indicação cirúrgica por outras causas – permitiram constatar que a gordura livre utilizada previamente estava integrada ao parênquima pulmonar, mostrando-se, macroscopicamente, como um tecido único.

A falta de estudos experimentais, em animais, sobre a aplicação de gordura livre autóloga no parênquima pulmonar com finalidade aerostática, dificulta o entendimento da real utilidade e viabilidade desse método na prática cirúrgica em humanos. Com poucas observações, ainda que promissoras, a evolução natural da gordura livre inserida no parênquima pulmonar segue pouco conhecida.

Até o momento, não existe descrito na literatura modelo experimental em animais utilizando gordura livre autóloga, inserida no pulmão, com a finalidade de aerostasia, conforme aqui proposto, e que demonstre sua viabilidade por neoformação vascular e integração tecidual.

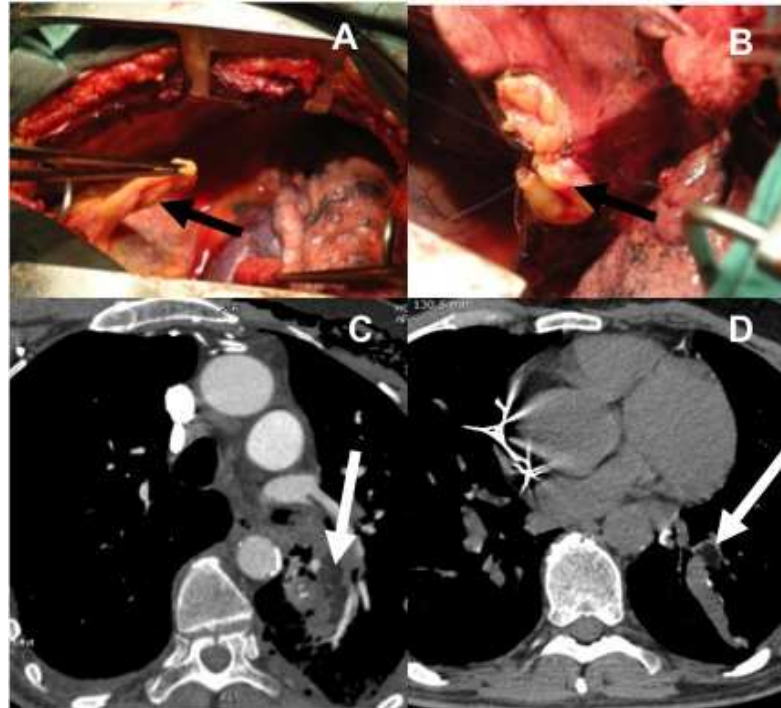


Figura 1: Paciente masculino de 61 anos submetido à lobectomia inferior esquerda por carcinoma brônquico. (A) isolamento da gordura pericárdica (seta preta); (B) enxerto de gordura pericárdica suturado na superfície pulmonar cruenta (seta preta); (C) Tomografia computadorizada demonstrando enxerto de gordura livre no interior do parênquima pulmonar (seta branca) 36 horas e (D) 3 meses após a ressecção pulmonar.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Escape de Ar nas Ressecções Pulmonares Parciais**

A literatura médica registra o escape de ar, ou fuga aérea dos pulmões, como sendo a ocorrência mais frequente na clínica cirúrgica envolvendo ressecções pulmonares parciais (Murthy SC, 2006; Brunelli A, 2010). Na absoluta maioria das vezes, o escape de ar advindo dos pulmões durante a operação é de origem alveolar, sendo observado pelos sistemas de drenagem pleural no período após a cirurgia. Este decorre da laceração do parênquima pulmonar distalmente aos brônquios segmentares, formando uma comunicação direta com o espaço pleural. Essa laceração pode ocorrer na linha de sutura manual ou por grampeamento, na superfície pulmonar adjacente à linha de sutura ou na liberação dos planos anatômicos pulmonares intercissurais, sendo também comum nos locais de aderências pleuropulmonares desfeitas durante a manipulação cirúrgica. Menos frequentemente, o escape de ar pode se originar de uma comunicação direta como o brônquio manipulado, situação esta que, na maioria das vezes, quando não corrigida no momento operatório, fará necessária a re-operação para a correção da fístula bronco-pleural. Apesar de sua frequência, o escape de ar tende a cessar em torno do terceiro dia após a ressecção pulmonar parcial. O EA considerado prolongado em sua evolução é arbitrariamente definido como aquele que persiste após o sétimo dia da operação, o que é fundamentado por inúmeros trabalhos corroborando este conceito (Brunelli A et al., 2004),(Lee L et al., 2011), (Rivera C et al., 2011).

### **2.2. Fatores de Risco Para Escape de Ar Prolongado**

Estudos consistentes apontam para os principais fatores de risco para EA prolongado nas ressecções pulmonares parciais (Brunelli A et al., 2010; Brunelli A, 2004; Cerfolio et

al, 2002). Dentre eles, a presença de DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) ocupa lugar de destaque (Brunelli et al, 2004; Merrit RE, 2010). No enfisema pulmonar e em suas apresentações clínicas, o tecido bolhoso com parênquima pulmonar escasso e frágil está mais propenso às lacerações da manipulação cirúrgica, tanto nas superfícies de sutura ou de grampeamento, quanto nas áreas contíguas. Essa constatação se mostra irrefutável quando analisados os resultados da cirurgia redutora do volume pulmonar para o tratamento cirúrgico do enfisema, onde são observados índices de até 90% de EA nos períodos após a cirurgia (DeCamp MM et al., 2006). Existe uma associação inversa nos parâmetros espirométricos e EA prolongado no período pós-operatório, ou seja, quanto mais baixo for o VEF<sub>1</sub>, maior a chance de escape de ar. Isto tem sido observado naqueles pacientes que apresentam VEF<sub>1</sub> abaixo de 1,5 litros ou menor que 79% para a previsão funcional pós-operatória, ou uma relação VEF<sub>1</sub>/CVF baixa, e o próprio VEF<sub>1</sub> abaixo de 70% do valor previsto (DeCamp MM et al., 2006). Outros estudos mais recentes apontam fatores de risco para EA prolongado, como, por exemplo, a capacidade de difusão do monóxido de carbono inferior a 80% do previsto, condições anatômicas no período após a cirurgia - como ressecções em lobos superiores - presença de aderências pleuropulmonares, e cirurgias para tratamento de câncer de pulmão (Sanchez PG et al., 2006) (Abolhoda A et al., 1998). São ainda considerados como fatores predisponentes ao EA prolongado as câmaras com pneumotórax residual e o uso crônico de corticosteróides (Cerfolio RJ,2002). De Camp e colaboradores mostraram, no âmbito da Cirurgia Redutora do Volume Pulmonar, um bom modelo para estudar o EA após ressecções pulmonares. Em uma análise da população do *National Emphysema Treatment Trial* (NETT) verificaram que o EA foi significativamente comum e mais prolongado naqueles pacientes com capacidade de difusão de monóxido de carbono reduzida, quando havia assimetria do enfisema nos lobos superiores ou presença de aderências pleuropulmonares ostensivas; nos usuários de corticosteroides inalatórios; em

indivíduos da raça caucasiana; e nos pacientes com VEF1 abaixo do previsto (80%) (DeCamp MM et al., 2006). Brunelli e colaboradores, em outra revisão recente, apontaram uma mortalidade de 1% ao analisarem 777 lobectomias pulmonares (Brunelli A et al., 2010). Nesse grupo, 13% dos pacientes apresentaram EA prolongado, o qual foi relacionado na análise multivariada com um VEF1 inferior ao valor previsto (80%) e com a presença de aderências pleurais. Porém, em outra avaliação dos pacientes da mesma instituição, empregando um escore de risco diferente, esses autores observaram que o EA prolongado estava associado com idade superior a 65 anos, com VEF1 menor de 80% do previsto, com IMC (Índice de Massa Corporal) menor de 25,5 e com a presença de aderências pleurais identificadas durante a cirurgia. Cerfólio e colaboradores também revisaram uma base de dados relativos a 669 pacientes, em que os preditores de EA prolongado foram: sexo masculino, uso de corticosteroide, VEF1 abaixo de 79% do previsto e ressecções pulmonares por lobectomias (Cerfolio et al, 2002). Os autores sugeriram como alternativa para reduzir o tempo de internação hospitalar a utilização da Válvula de Heimlich, com a qual obtiveram índices favoráveis e significativos.

### **2.3. Tratamento do Escape de Ar Prolongado.**

O tratamento do EA durante a ressecção pulmonar fundamenta-se em três princípios bem estabelecidos, a saber: a prevenção, o reparo e o provimento para a sua resolução. A prevenção começa pelo preparo do paciente, diminuindo fatores de risco como, por exemplo, a suspensão do uso de corticosteróides e melhora das condições nutricionais. Nos portadores de enfisema pulmonar, as recomendações técnicas deverão estar voltadas para um manuseio cirúrgico cuidadoso ao se completarem as cissuras anatômicas. Têm sido rediscutidas atualmente as maneiras de se completarem as cissuras não anatômicas e suas implicações na fuga aérea pelos pulmões após ressecções pulmonares parciais (Balsara KR

et al., 2010). A técnica convencional para lobectomias inclui a dissecação das cissuras para se obter acesso às ligaduras das artérias e, na sequência, dos brônquios dos respectivos lobos. Com o advento da cirurgia vídeotoroscópica, uma alternativa técnica vem sendo difundida, ou seja, a abordagem inicial no hilo pulmonar, iniciando com a ligadura dos vasos, para depois serem completadas as cissuras anatômicas, subtraindo a necessidade de dissecá-las previamente.

Gómez-Caro efetuaram um estudo randomizado em 63 pacientes com cissuras incompletas (Gomez-Caro A et al., 2007), os quais foram submetidos a ressecções pulmonares por lobectomias. Concluíram, nesse estudo, que os pacientes operados pela técnica convencional apresentaram uma incidência significativamente maior de EA prolongado no período após a cirurgia, além de permanecerem hospitalizados por tempo maior. Outro estudo semelhante, publicado no mesmo ano, avaliou 27 pacientes submetidos a lobectomias superiores operados pela técnica convencional (Ng T et al., 2010), comparados com 66 outros operados pela técnica alternativa, sem dissecação das cissuras anatômicas. Os resultados mostraram uma incidência de EA prolongado maior no primeiro grupo (22,2%), contra 6,5% no segundo. O tempo de internação também foi bem maior no primeiro grupo (média de 14,8 dias) se comparado ao segundo grupo (média de 8,7 dias), em que foi utilizada a técnica alternativa da vídeotoroscopia. Droghetti e colaboradores, abordando esse mesmo questionamento, randomizaram e estudaram prospectivamente vinte pacientes em dois braços (Droghetti A et al., 2008) submetidos a procedimentos distintos. Em um deles a ressecção foi realizada com dissecação de precisão na cissura anatômica, e no outro utilizando grampeadores mecânicos. No grupo da dissecação precisa anatômica foi adicionado um selante de fibrinogênio humano com trombina para cobertura da superfície pulmonar cruenta. Concluíram que no grupo da dissecação anatômica precisa com adição do selante obtiveram melhores resultados quanto

ao escape de ar (EA) no período após a cirurgia (51%), contra 95% no grupo em que se utilizou o grampeamento. O tempo de drenagem pleural após a cirurgia também foi significativamente menor no primeiro grupo (1,7 dias) do que no segundo (4,5 dias). Os custos dos procedimentos do primeiro grupo de pacientes também foram significativamente menores.

Cooper e colaboradores, em 1995, retomaram a cirurgia redutora do volume para tratamento do enfisema. Introduziram, tecnicamente, um reforço na linha de sutura pulmonar utilizando pericárdio bovino acoplado ao grampeador mecânico, com a finalidade de reduzir o escape de ar que chegava acometer 90% dos pacientes submetidos a essa modalidade terapêutica (Cooper JD et al., 1995). A utilização do reforço de pericárdio na linha de grampeamento mecânico, teoricamente, diminuiria o espaço entre os orifícios dos grampos e evitaria que a sutura cedesse ao insuflar o pulmão. Esse reforço pode ser obtido com pericárdio bovino ou material de origem sintética, como o PTFE (politetrafluoretileno). Ainda não se dispõem, entretanto, de dados consistentes que justifiquem o uso rotineiro desse material no âmbito das ressecções pulmonares parciais. Por outro lado, existe ainda a possibilidade de que o material de reforço exerça uma pressão maior sobre a linha de sutura, paradoxalmente favorecendo o escape de ar. A escolha da população que realmente poderá se beneficiar com o emprego desse reforço na linha de sutura inclui os portadores de enfisema pulmonar submetidos à cirurgia redutora de volume pulmonar, ou nos outros portadores de enfisema pulmonar submetidos a ressecções não anatômicas.

Um estudo envolvendo pulmões de cadáveres estimou a força necessária para produzir escape de ar na linha de sutura com a utilização de grampeadores mecânicos, e com grampeamento incluindo pericárdio bovino ou PTFE (Murray KD et al., 2002). Os resultados desse estudo foram expressos da seguinte maneira: no grupo em que foi utilizado



grampeamento sem qualquer reforço observou-se escape de ar com pressões de 35 mmHg em 90% dos casos; no grupo que usou reforço do grampeamento com pericárdio bovino ou PTFE foram necessárias pressões de 40mmHg ou mais para que fosse observado EA na linha de sutura. Em especial, no grupo onde o reforço do grampeamento foi constituído por PTFE, as pressões necessárias para ocorrer EA na linha de sutura foram, no mínimo, de 55 mmHg.

Em outro estudo, com pulmões de cães, foram necessárias pressões médias, da ordem de 10,8 cm de H<sub>2</sub>O maiores, para atingir escape aéreo no grupo onde foi utilizado reforço na linha de grampeamento, em comparação com o grupo que não utilizou esse aditivo (Roberson LD et al., 1998).

Outra alternativa é o emprego de colas biológicas para proteger linhas de sutura e prevenir escape de ar após as cirurgias pulmonares. Rice e Blackstone definiram como o selante ideal aquele que aderisse rapidamente ao parênquima pulmonar, que mesmo na presença de ar ou sangue suportasse pressões inspiratórias de até 40 cm de H<sub>2</sub>O e que tivesse flexibilidade e complacência suficientes para permitir os movimentos de inspiração e expiração (Rice TW & Blackstone EH, 2010). Infelizmente, até o presente momento, esse material não está disponível. Um selante biológico contendo fibrina e trombina, a assim chamada cola biológica, se mostrou eficaz para prevenir a fuga aérea em um estudo experimental em 28 ratos da raça Wistar (Turk R et al., 1983) – coincidentemente, a mesma raça utilizada no nosso estudo. Os animais receberam, ou não, reforço com a cola biológica sobre a linha de sutura manual no parênquima pulmonar. Em outros sete estudos clínicos randomizados, nos quais foi avaliada a eficácia da cola biológica para prevenir o escape de ar em pacientes submetidos a ressecções pulmonares, foi mostrado que o tempo de drenagem e o período de internação hospitalar não foram significativamente diferentes ao se utilizar ou não o reforço com essa cola (Rice TW & Blackstone EH, 2010). O

glutaraldeído está entre os selantes sintéticos, com adição de albumina, também avaliado experimentalmente. Os resultados verificados em ratos se mostraram superiores aos do selante de fibrina (Kodama K et al., 1997). Outro estudo clínico randomizado mostrou melhores resultados e menor período de drenagem pós-operatória, com menor tempo de internação, no grupo de intervenção pelo selante glutaraldeído (Transley P et al., 2006). O selante sintético com polietilenoglicol só foi avaliado na esfera experimental, mostrando-se superior à cola biológica em parênquima pulmonar de ratos (Kobayashi H et al., 2001). No âmbito clínico assistencial, esses estudos uni-institucionais, ou mesmo multi-institucionais, têm mostrado que os selantes são eficazes para diminuir o tempo de escape de ar no período após a cirurgia. No entanto, esse benefício não é significativo para diminuir o tempo de internação, tampouco para reduzir custos. Outro selante obtido recentemente com uma associação de colágeno e fibrina, bem estudado em cirurgia vascular e hepática, não mostrou resultados consistentes que sugiram menores períodos de escape de ar ou tempo da internação (Rice TW & Blackstone EH, 2010).

Enquanto as superfícies que apresentam pequeno escape de ar durante a cirurgia cicatrizam em torno de 2 a 3 dias, aquelas áreas de maior escape tendem a cicatrizar em tempos mais longos, conseqüentemente levando a implicações clínicas que podem conduzir à reoperação. Mesmo com o enorme conhecimento acumulado em estudos clínicos, embasados em pesquisas experimentais, ainda não há parâmetros objetivos que definam quando empregar medidas intra-operatórias para controlar o escape de ar de origem alveolar. Os métodos de reparo intra-operatórios para coibir o EA estão, na verdade, mais diretamente relacionados com experiência individual do cirurgião torácico. O espectro de recursos disponíveis vai de uma sutura manual simples até uma interposição de material autólogo como pleura, pericárdio, gordura ou até uma sutura mecânica com interposição de material biológico ou sintético, conforme já mencionado.

Outra questão para ser avaliada no momento da ressecção é o grau de reexpansão do pulmão remanescente. A cessação do escape de ar depende, pelo menos em parte, da aposição das pleuras visceral e parietal. A total expansão do pulmão remanescente operado, preenchendo a cavidade pleural, se impõe como um objetivo constante em todas as ressecções pulmonares. Os pequenos ramos brônquicos subsegmentares requerem atenção redobrada na abordagem aerostática final, por serem mais refratários ao benefício dos selantes. As aderências pleurais também podem interpor dificuldades na reexpansão e precisam ser meticulosamente desfeitas. A liberação do ligamento pulmonar até a veia pulmonar inferior também ajuda na reexpansão pulmonar nas lobectomias. Caso não se obtenha a desejada expansão do pulmão operado, uma alternativa simples é a aplicação de bupivacaína (Rocco G, 2010) para anestesia transitória do nervo frênico. Com essa manobra, ocorre a elevação do diafragma, persistindo por aproximadamente 24 horas, auxiliando no pronto contato entre as pleuras e impedindo a persistência de eventual câmara de pneumotórax no ápice da cavidade hemitorácica. Outra opção transoperatória que auxilia a diminuir o escape de ar é a liberação da pleura parietal apical. O espaço criado entre a fáscia endotorácica e a pleura parietal, denominado tenda pleural, já foi estudado e utilizado em várias oportunidades, mostrando-se também eficaz para diminuir o espaço pleural e favorecer a pleurodese (Ugurlu BS et AL., 2002). O pneumoperitônio tem sido também bastante empregado em ressecções dos lobos inferiores, com a mesma finalidade de proporcionar diminuição do espaço pleural (Giacomo T et al., 2001).

O controle do EA após ressecções pulmonares parciais também pode ser obtido por pleurodese. Para obtenção da sínfise pleural reversível cirurgicamente, a pleurodese pode ser abrasiva ou química, dependendo das condições clínicas do paciente. A pleurectomia parietal, quando empregada, resulta em síntese definitiva (Derek P et al., 2008). O inconveniente dessa alternativa é a dificuldade imposta para novas abordagens no pulmão

operado. Quando a pleurectomia for total, a possibilidade de ressecções pulmonares parciais futuras torna-se impraticável, restando a pneumonectomia como única opção cirúrgica. Nos tempos atuais, em que a terapêutica por transplante pulmonar encontra-se disponível, e que pode ser indicada naqueles pacientes submetidos a ressecções pulmonares parciais prévias, a pleurectomia poderá limitar o acesso a essa modalidade de tratamento, devendo, portanto, ser reservada para casos selecionados (Camargo JJ et al., 2011). Além disso, é conhecido o risco do sangramento potencializado pela sínfise pleural e pela eventual necessidade de utilização de CEC (Circulação Extra-Corpórea). As medidas mais extremas no sentido de aproximar as superfícies pleurais envolvem o emprego de toracoplastia ou mioplastia com transposição da musculatura da parede torácica. Essas técnicas são mais complexas e exigem treinamento específico. Os músculos mais utilizados em tal procedimento são o grande dorsal e o músculo serrátil anterior. A magnitude dessa modalidade cirúrgica para tratamento do escape de ar está reservada para casos refratários e muito bem selecionados (Stefani A et al., 2011).

#### **2.4 . Escape de Ar Prolongado em Ressecções Pulmonares Parciais**

Duas implicações maiores acompanham as ressecções pulmonares parciais: o escape aéreo prolongado e o tempo de drenagem torácica. Uma terceira estaria ligada ao período de internação que estes pacientes necessitam, muito embora, alguns deles possam deixar o hospital com válvulas unidirecionais, tipo Heimlich, diminuindo o tempo de hospitalização. A implicação em custos também deve ser considerada, visto que Varela e colaboradores, ao analisarem 238 pacientes submetidos à lobectomias pulmonares, obtiveram índices de 9,7% de EA prolongado (Varela G et al., 2005). Essa constatação implicou no dobro do período de internação e significativo aumento nos custos hospitalares. O maior número de complicações pós-operatórias como atelectasias, retenção

de secreções, infecções do trato respiratório e do espaço pleural somam-se as implicações de EA prolongado. Outra preocupação importante com o escape de ar prolongado recai sobre o plano de tratamento para aqueles pacientes operados por neoplasia de pulmão estágios II e IIIa, com necessidade de adjuvância por quimioterapia. A indicação de tratamento é bem fundamentada e com bons resultados (Cerfolio RJ et al., 2008). No entanto, em virtude de complicações pós-operatórias com retardo na recuperação desses pacientes, o tratamento proposto, muitas vezes, não pode ser completado, ou mesmo iniciado. O impacto negativo do escape de ar prolongado nesse grupo de pacientes com tratamento multidisciplinar pode ser imaginado.

## **2.5. Estudos Locais Referentes ao Escape de Ar Prolongado**

Sanchez e colaboradores estudaram 305 pacientes submetidos a lobectomias pulmonares para tratamento de carcinoma brônquico, avaliando nesse grupo os índices de morbi-mortalidade (Sanchez PG et al., 2006). A mortalidade nos primeiros 30 dias foi de 2,9% e a morbidade de 44,0%. A principal e a mais frequente complicação foi o escape de ar prolongado, numa incidência de 20,6%. Os pacientes que apresentaram complicações pós-operatórias tinham IMC, VEF1 e relação VEF1/CVF significativamente menores do que o previsto. A DPOC não figurou como fator relacionado com mortalidade geral; no entanto, quando foi estratificado o grupo de pacientes de acordo com a severidade da doença, aqueles com DPOC e índices funcionais bem abaixo do previsto apresentaram mais complicações no período que se seguiu à cirurgia. Na análise multivariada de fatores relacionados às complicações respiratórias, o VEF1 abaixo do valor previsto e o escape de ar prolongado mostraram-se significativos. No grupo de pacientes com EA prolongado observaram uma incidência maior de insuficiência respiratória aguda e de empiema pleural. O lobo ressecado não manteve correlação com o escape de ar prolongado, mas sim, com

índices de VEF1 e IMC menores do que o previsto. Em outro estudo abordando especificamente o problema do escape de ar prolongado em pacientes que haviam sido submetidos a lobectomias pulmonares por câncer de pulmão, foi observado um período médio de drenagem pleural de 11,4 dias, variando de 7 a 24 dias (Rivera C et al., 2011). Também nesse estudo, o escape de ar prolongado correlacionou-se com índices de VEF1 e IMC menores que o previsto e com mortalidade superior de 10,0% nesses pacientes. A severidade do enfisema associou-se com maior tempo de fuga aérea pelos drenos pleurais.

No âmbito experimental, um estudo foi realizado para testar diferentes tipos de sutura aerostática em pulmões de suínos sob pressões determinadas por insuflação pulmonar até o aparecimento de fuga aérea na linha de sutura. (Pinto Filho DR, 2003) As suturas testadas foram: sutura manual do parênquima pulmonar com fio absorvível, com grampeador mecânico, com grampeador mecânico revestido por pericárdio bovino ou com grampeador mecânico revestido por selante biológico de fibrina. As pressões médias necessárias para a ocorrência de vazamento na linha de sutura foram de 29,0 cm de H<sub>2</sub>O, 38,5 cm de H<sub>2</sub>O, 44,0 cm de H<sub>2</sub>O e 51,4 cm de H<sub>2</sub>O, respectivamente, para sutura simples, sutura com grampeador mecânico, com grampeador mecânico revestido de pericárdio bovino e grampeador mecânico revestido por selante biológico de fibrina.

## **2.6. Estudos Experimentais de Gordura como Selante**

O enxerto autólogo de tecido adiposo livre tem sido utilizado com sucesso em outras especialidades além da cirurgia torácica, a saber: na neurocirurgia, na cirurgia da cabeça e pescoço, e na otorrinolaringologia. Shimizu e colaboradores avaliaram a eficácia da gordura livre autóloga livre preenchendo as lacunas resultantes da hemi-laminectomia em cães (Shimizu J et al., 2003). Uma complicação bem conhecida após esse procedimento é a formação de aderências da dura-máter exposta aos tecidos adjacentes no local da

laminectomia, com consequente dor no período pós-operatório. Na tentativa de evitar a formação de aderências, os autores protegeram o local abordado com enxerto de gordura livre. O controle incluiu tomografia computadorizada, mielografia e exame histológico da gordura integrada. Ao contrário dos cães controle, sem proteção da gordura, o grupo da intervenção com gordura não mostrou formação de aderências na dura-máter. Também não verificaram compressão do enxerto de gordura livre na medula espinhal. Os cães foram acompanhados por 56 dias, período no qual, ao final, os autores perceberam que existia apenas um vestígio de tecido adiposo no local da laminectomia prévia, redução que foi atribuída à apoptose das células de gordura. Em uma observação antiga, o que embasava a resistência dos neurocirurgiões em utilizar esse enxerto nos defeitos após laminectomia era a potencial migração de gordura para o canal medular com agravo clínico do paciente. Essa situação não foi observada em nenhum caso do estudo experimental acima referido.

Nishimura e colaboradores, em outro estudo para avaliar a evolução de enxerto de gordura livre autóloga transplantada para o dorso de ratos Wistar, concluíram que houve uma revascularização do enxerto com expressão de VEGF por células conjuntivas a partir do sétimo dia pós-implante (Nishimura T et al., 2000). Os autores sugeriram que até o quarto dia o tecido adiposo adquire sua nutrição após embeber-se nos fluidos intersticiais. No entanto, após 180 dias, observaram uma redução do enxerto para 32% do seu peso inicial. Um dos mecanismos potencialmente envolvidos nessa redução foi a apoptose ou morte celular programada. Os marcadores para apoptose foram identificados por imunohistoquímica a partir do sétimo dia do experimento.

## **2.7. Estudos Clínicos com Aplicação de Gordura**

O epíplon vem sendo utilizado como fonte de gordura autóloga há bastante tempo. Cooper e colaboradores difundiram sua utilização com o advento do transplante pulmonar.

Um fator limitante para progressão do transplante pulmonar foi anastomose brônquica com suas complicações inerentes. Eles passaram a utilizar a cobertura da anastomose brônquica com auxílio do epíplon pediculado (Morgan E et al., 1982; Morgan et al., 1983). Dessa maneira, diminuíram significativamente o índice de deiscências brônquicas. Shrager e colaboradores revisaram 85 pacientes em que o epíplon pediculado foi utilizado em cirurgia torácica (Shrager et al., 2003), como medida profilática em 47 pacientes, com 89,0% deles bem sucedida. Dentre essas aplicações, 20 foram para proteger a anastomose brônquica do transplante pulmonar, outras 14 foram utilizadas para proteger a sutura brônquica após a ressecção da via aérea central, em 07 para proteger áreas expostas do pescoço após exenteração da parede do tórax, e em 06 casos a utilização do epíplon teve como objetivo a proteção do coto brônquico após pneumonectomia em que havia risco, aumentado de deiscência pós-irradiação, imunossupressão ou infecção ativa. Com objetivo terapêutico, o epíplon foi utilizado em 32 casos com sucesso em 91,0% deles, assim relacionados: 15 em portadores de fístula bronco-pleural após pneumonectomia, em que a resutura foi acompanhada de proteção pelo epíplon; 09 para tratamento da mediastinite após esternotomia; 03 em perfurações esofágicas tardias; 05 em complicações traqueo-esofágicas para tratamento do esôfago; e em 06 pacientes para proteção de ressecções ampliadas da parede torácica.

Yoshimura e colaboradores, em um estudo randomizado, avaliaram a eficácia do retalho de gordura pericárdica pediculado e da cola biológica para reparar superfícies cruentas após lobectomias ou segmentectomias para tratamento cirúrgico de câncer de pulmão (Yoshimura M et al, 2002). Quando o escape de ar era considerado moderado no transoperatório, os autores utilizaram a cola de fibrina ou um enxerto de gordura pericárdica pediculado fixado na superfície pulmonar cruenta com auxílio da cola de fibrina. Observou-se que em um número significativamente maior de pacientes que recebia



também a gordura pericárdica pediculada, o escape de ar cessava após 24h da cirurgia, com um tempo médio de drenagem pleural de 3,6 dias no grupo que utilizou a gordura pericárdica, contra 4,8 dias naqueles que utilizaram somente a cola de fibrina.

Matsumoto e colaboradores realizaram um estudo semelhante, porém com o emprego de enxerto de gordura pericárdica não pediculada em modelo canino em quatro experimentos (Matsumoto I et al., 2005). Em nenhum deles houve necessidade de drenagem pós-operatória, tendo os cães sido observados por trinta dias. Após esse experimento, utilizaram o enxerto de gordura livre em 23 pacientes portadores de enfisema submetidos a ressecções pulmonares por neoplasia primária de pulmão ou por doença metastática. Eles apresentaram escape de ar importante, mesmo após uma aerostasia mecânica adequada. O enxerto de gordura utilizado a seguir promoveu significativa redução do escape de ar, encurtamento do tempo de drenagem pleural, na ausência de efeitos adversos verificados por TC.

## **2.8. Utilização de Gordura Livre Como Fonte de Células Tronco**

O transplante de células adiposas se firmou como modalidade terapêutica no campo da cirurgia plástica reconstrutora. Tem sua principal limitação na dificuldade de manter o volume do enxerto. Iyama e colaboradores observaram, em estudos com microscopia eletrônica, que as células do enxerto têm uma maior capacidade de diferenciação quando são implantadas em locais de boa vascularização (Iyama K et al., 1979). Outra aplicação do transplante de células adiposas se refere à sua atividade metabólica. Quando foram transplantadas células adiposas do subcutâneo ou do epidídimo de ratos normais em ratos com indução genética de uma lipodistrofia, o novo tecido gorduroso passou a suprir a função metabólica do organismo deficiente. Assim, os efeitos maléficos da lipodistrofia, como ingestão excessiva de alimentos, hiperinsulinemia e esteatose hepática foram

revertidos. O efeito da leptina sobre essas vias metabólicas é fundamental. No mesmo experimento, quando foi utilizando enxerto de gordura em ratos deficientes em leptina, não foram reproduzidos os efeitos benéficos inicialmente observados.

As células adiposas estão sendo utilizadas no campo da cirurgia torácica como fonte de células estromais produtoras de fatores de crescimento. Um dos mecanismos de formação do enfisema pulmonar está relacionado à falha de manterem-se níveis séricos adequados do fator de crescimento de hepatócitos. A suplementação desse fator de crescimento é capaz de restaurar a troca gasosa nos pulmões promovendo a regeneração vascular.

Shigemura e colaboradores mostraram que é possível utilizar o transplante de células adiposas como via de provimento desse importante mediador (Shigemura et al, 2006). Ao coletarem células estromais da gordura do subcutâneo de ratos e, depois de comprovarem que essas células constituíam fontes abundantes de fator de crescimento de hepatócitos, elas foram injetadas na circulação sistêmica de ratos com enfisema induzido por elastase pancreática porcina. Os ratos submetidos a esse tratamento apresentaram níveis de fator de crescimento de hepatócitos significativamente mais elevados do que os do grupo controle. Os autores deduziram que haveria uma maior taxa de proliferação celular e menor atividade apoptótica, o que se traduziu em melhores índices gasométricos e melhora na capacidade de exercício naqueles ratos do grupo tratado com a infusão de células estromais de gordura. Ao seguirem a mesma linha de pesquisa, esses autores implantaram uma matriz com células estromais a partir de tecido adiposo inserido na superfície cruenta de pulmões de ratos submetidos à cirurgia redutora de volume pulmonar. A regeneração vascular e alveolar desses pulmões foi significativamente mais acentuada que a ocorrida em ratos sem o tratamento com células estromais, verificando-se, também, melhores parâmetros gasométricos e a maior capacidade de exercício dos animais tratados.

Em uma recente revisão, Warburton e col. descreveram a morfogênese pulmonar e os mecanismos de reparo do epitélio alveolar – função chave para a sobrevivência. Entre as alternativas terapêuticas para a regeneração do epitélio alveolar está a aplicação de células tronco progenitoras exógenas pelas vias intravenosa, traqueal ou injeção direta no parênquima pulmonar. Atualmente, além das células embrionárias, das células da medula óssea, das células progenitoras endoteliais e das células tronco do líquido amniótico, o uso de células adiposas mesenquimais tem sido estudado para aplicação terapêutica no parênquima pulmonar com o objetivo de reverter os efeitos do envelhecimento e das patologias pulmonares. Particularmente, os pacientes com insuficiência respiratória devido à hipoplasia ou destruição alveolar grave, como encontrado na displasia broncopulmonar e na DPOC, são o alvo principal desta terapêutica.

Enquanto estudos recentes têm demonstrado que estas células têm a capacidade de amenizar a lesão pulmonar, parece que este mecanismo de reparo tem uma característica pseudofarmacológica, cursando com a liberação transitória de citocinas anti-inflamatórias e estimulação de reparo por mecanismo endógeno. Porém, estas células também tem o potencial de contribuir no desenvolvimento de fibrose. São necessários, pois, mais estudos para o entendimento claro do mecanismo subjacente aos efeitos destas células e para sua manipulação em direção a uma resposta terapêutica eficaz (Warburton, D. et al., 2008).

### **3. JUSTIFICATIVA**

Existem diferentes métodos de aerostasia pulmonar descritos na literatura. A utilização de enxerto de gordura livre mostrou-se efetiva na nossa observação clínica, quando utilizada no intra-operatório de ressecções pulmonares com dificuldade de controle do escape de ar. Estes resultados encorajadores motivaram o estabelecimento de um modelo de aerostasia pulmonar com uso de enxerto de gordura livre, a fim de verificar o comportamento deste enxerto dentro do parênquima pulmonar durante diferentes períodos de observação.

Este estudo pretende oferecer informações relevantes sobre a utilização do enxerto de gordura livre autóloga no parênquima pulmonar de ratos, e, assim, estimular a sua utilização clínica com o intuito de reduzir o problema do escape de ar na prática da cirúrgica torácica envolvendo ressecções pulmonares parciais.

## 4. OBJETIVOS

### Geral:

Apresentar um método cirúrgico de aerostasia pulmonar transoperatória a partir da utilização de gordura livre autóloga.

### Específicos:

1. Estabelecer o modelo de enfisema pulmonar em ratos utilizando elastase pancreática porcina.

2. Desenvolver um modelo de trauma pulmonar perfurante periférico, com consequente fuga aérea do parênquima pulmonar, em ratos com pulmões normais e em ratos com enfisema pulmonar induzido por elastase pancreática porcina.

3. Desenvolver um modelo de trauma pulmonar perfurante periférico, com consequente fuga aérea do parênquima pulmonar, em ratos com pulmões normais e em ratos com enfisema pulmonar induzido por elastase pancreática porcina.

4. Avaliar a integração e a viabilidade tecidual do enxerto de gordura livre autóloga no parênquima pulmonar de ratos, como um modelo experimental em animais de pequeno porte.

## **5. METODOLOGIA**

### **O Presente estudo foi realizado em duas etapas:**

Na primeira etapa foi estabelecido um modelo de trauma pulmonar perfurante periférico seguido de aerostasia com gordura livre autóloga obtida do epíplon de ratos com pulmões normais (Estudo piloto).

Na segunda etapa, o mesmo procedimento foi aplicado em ratos com pulmões normais e em ratos com enfisema pulmonar experimental induzido por elastase pancreática porcina (Sigma-Aldrich).

#### **5.1. Estudo Piloto**

Sete ratos da raça Wistar foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de Ketamina (50mg/Kg) e Xylazina (50mg/Kg), pesados em balança de precisão e intubados por via orotraqueal com uma cânula intravenosa número 14 gauge (Abbocath<sup>®</sup>, Abbott Laboratories, Columbia, Maryland, EUA). Os animais foram mantidos em ventilação mecânica, com ar ambiente, por um aparelho ciclado a volume (Harvard Rodent Ventilator, South Natick, MA, modelo 683). Regime ventilatório: volume de ar corrente de 10ml/Kg do peso corporal, frequência de 85 respirações por minuto e PEEP de 2 cmH<sub>2</sub>O. Após serem anestesiados, foram submetidos a uma pequena laparotomia mediana, por onde um fragmento de epíplon foi extraído (Figura 2). A incisão laparotômica foi fechada por sutura simples, com fio monofilamentar não absorvível quatro zeros (Mononylon<sup>®</sup>, Ethicon, EUA).

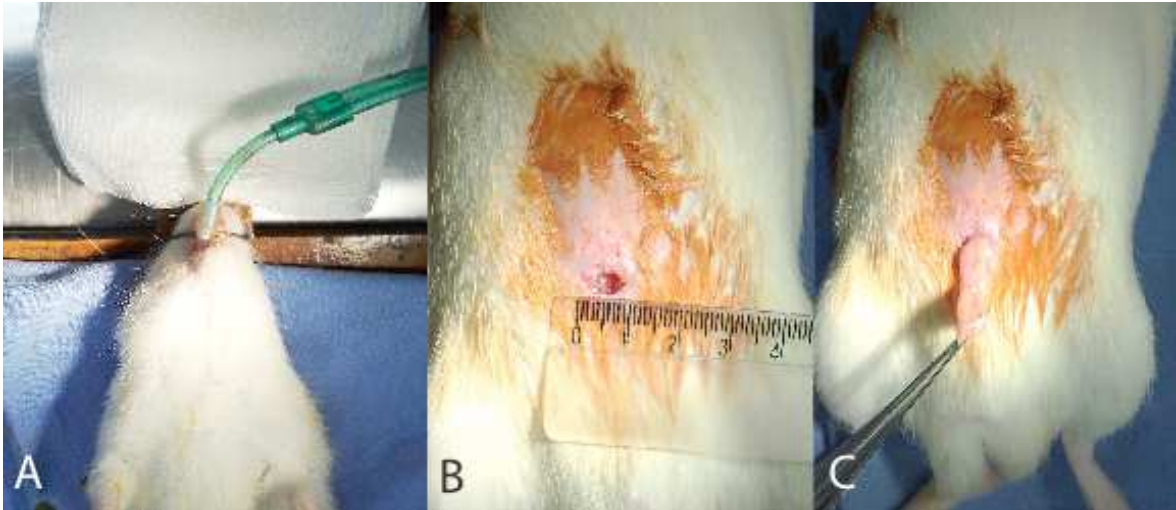


Figura 2. A: Intubação orotraqueal B: Laparotomia ( $\pm 1$  cm) no terço inferior do abdome C: Gordura do Epíplon

Na sequência, os animais foram colocados em decúbito lateral esquerdo para serem submetidos a uma toracotomia póstero-lateral direita no nível do quinto espaço intercostal. Com a cavidade aberta, o ligamento pulmonar foi liberado através de dissecação roma com ampla exposição da base do lobo inferior do pulmão direito. De modo semelhante ao modelo descrito por Dutly e colaboradores, foi realizada na topografia da base da pirâmide pulmonar uma perfuração periférica de 5,0 mm de profundidade, utilizando-se agulha número 14 gauge (Abbocath<sup>®</sup>, Abbott Laboratories, Columbia, Maryland, EUA) (Dutly AE et al., 2005). O escape de ar foi comprovado pelo aumento na pressão (PEEP) de ventilação para 5 cmH<sub>2</sub>O. O próprio cateter protetor da agulha utilizada no trauma perfurante do pulmão foi acoplado a uma seringa plástica de 1,0 ml para receber o fragmento de gordura livre obtida do epíplon, até então imerso em soro fisiológico. Essa manobra permitiu introduzir parte da gordura livre na seringa por leve sucção, mantendo parte no cateter acoplado (Figura 3). A gordura foi, assim, injetada na perfuração pulmonar traumática de tal modo que se obtivesse a obliteração completa da laceração que havia sido produzida (Figura 4). O volume do enxerto de gordura livre autóloga aplicado foi de 0,1 ml para cada animal estudado. No momento em que o efeito aerostático do enxerto de gordura livre era comprovado por imersão do pulmão em solução

fisiológica sob ventilação – “teste do borracheiro” (Pinto Filho DR, 2003) –, a re-expansão do pulmão ocorria com auxílio do ventilador mecânico, oferecendo pressões de 5 cmH<sub>2</sub>O de PEEP, ao mesmo tempo em que a toracotomia era fechada sem auxílio de drenagem pleural. A analgesia pós-operatória contou com o emprego de buprenorfina (0,05mg/Kg) intramuscular, acrescida ao anestésico local (lidocaína, 5 ml a 1%), dirigido às regiões posteriores da incisão.

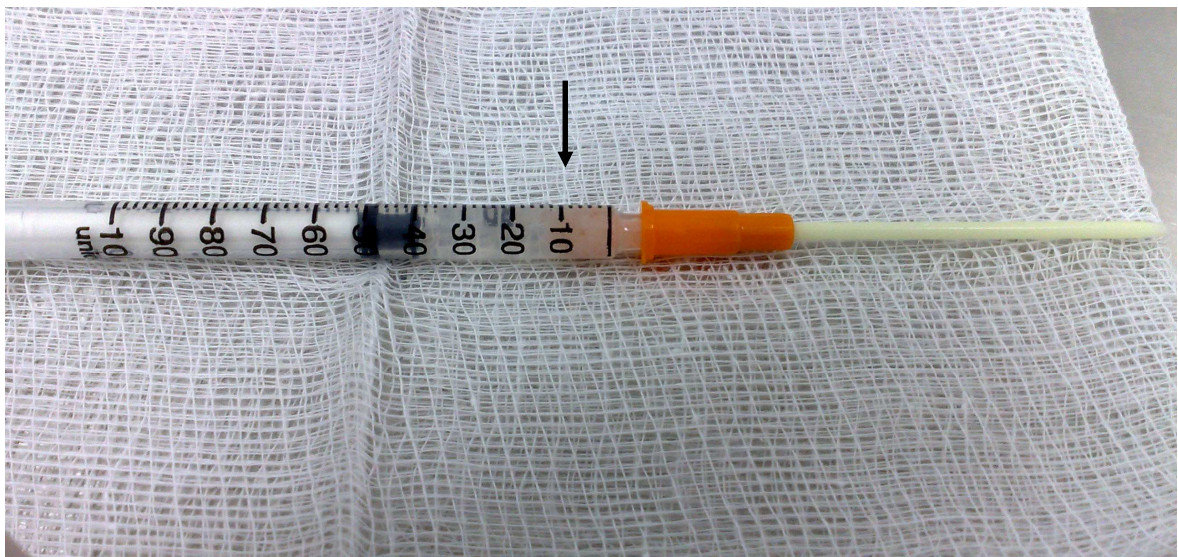


Figura 3. Gordura preparada em seringa de 1ml para enxertia no pulmão (seta).



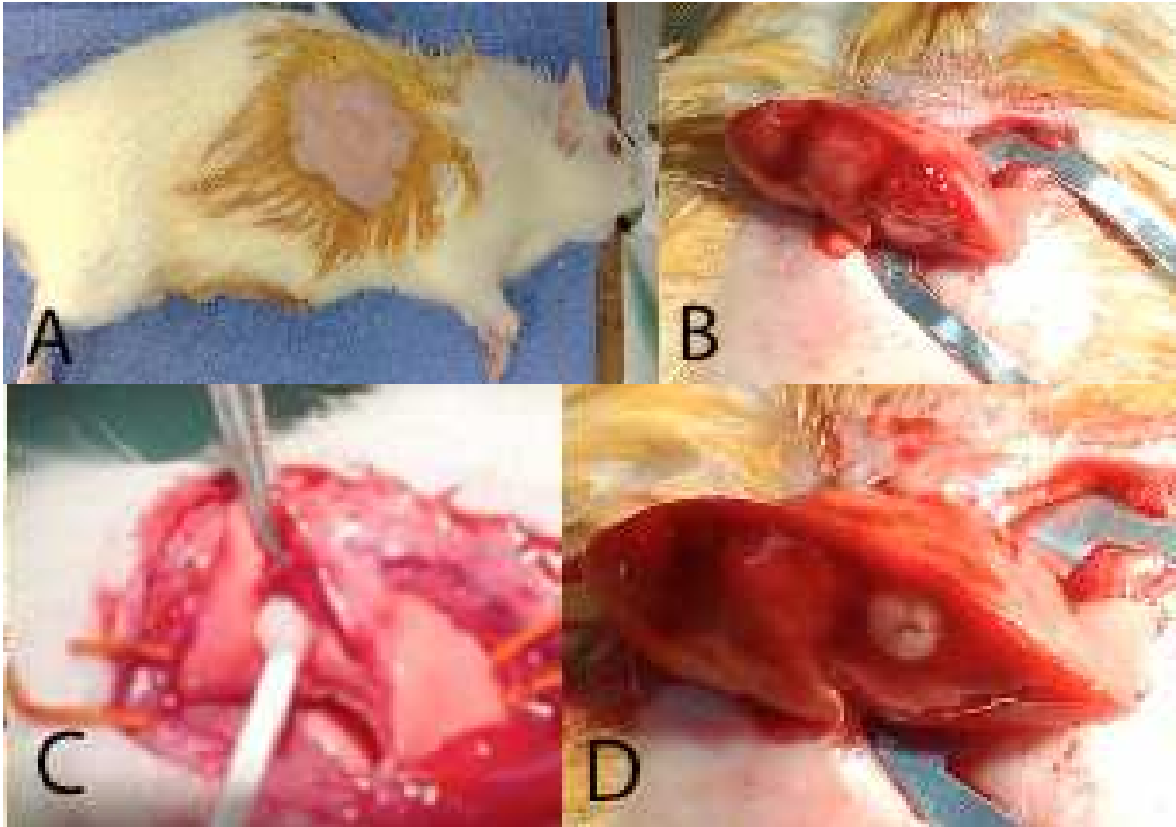


Figura 4. A: Rato em decúbito lateral esquerdo; B: Pulmão após trauma penetrante periférico e teste da fuga aérea; C: Injeção da gordura livre autóloga obtida do epíplon na base pulmonar; D: Gordura na base do pulmão com aerostasia completa.

## 5.2. Indução Experimental do Enfisema Pulmonar

Na segunda etapa do estudo foram utilizados ratos com pulmões normais e ratos com enfisema pulmonar. Para a indução do enfisema, os ratos foram anestesiados da maneira semelhante à técnica anestésica empregada no estudo piloto, seguida da instilação de elastase pancreática porcina em uma dose de 10U por animal. A enzima pancreática foi administrada por via endotraqueal durante dois minutos, da seguinte maneira: duas unidades com o animal em decúbito dorsal, duas unidades em decúbito lateral direito, duas unidades em decúbito ventral, duas unidades em decúbito lateral esquerdo, e duas últimas unidades com o animal em movimento rotatório. As manobras para a administração da enzima pancreática porcina objetivavam a distribuição uniforme da elastase nos diversos

segmentos pulmonares. Concluído o procedimento cirúrgico, os animais foram recuperados em incubadora, aquecida a 37° C, recebendo oxigênio suplementar. Na sequência da recuperação anestésica, os animais foram observados por trinta dias para serem incluídos na segunda etapa do estudo.

### **5.3. Randomização: Pulmões Normais ou com Enfisema pulmonar**

Os animais foram divididos em dois grupos: com enfisema experimental (n=30) e com pulmões normais (n=30). Os dois grupos foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito no estudo piloto. A partir do pós-operatório da toracotomia, os animais dos dois grupos foram distribuídos aleatoriamente em subgrupos, para serem observados em períodos estabelecidos de 7, 14, 21, 30 e 60 dias. Assim, cada subgrupo ficou constituído por seis animais. Ao final de cada um dos períodos de observação os animais foram sacrificados.

O sacrifício foi efetuado com os animais anestesiados e ventilados pela técnica descrita no procedimento cirúrgico experimental. A partir de então, uma esternotomia mediana foi realizada. O pulmão direito e o enxerto de gordura livre foram analisados macroscopicamente. Na sequência final do procedimento, o tronco da artéria pulmonar foi canulado através do ventrículo direito, a aorta clampeada e a aurícula esquerda seccionada. Nesse momento, os pulmões foram perfundidos com 20 ml de soro fisiológico sob uma pressão de 25 cmH<sub>2</sub>O. A pressão foi calibrada colocando-se o frasco que continha a solução fisiológica à 25 cmH<sub>2</sub>O acima do nível dos pulmões. Para posterior comprovação da permeabilidade dos vasos sanguíneos no enxerto de gordura livre, três ratos de cada subgrupo de seis animais receberam uma perfusão adicional de 4,0 ml de Tinta da China, inserida pelo cateter na artéria pulmonar sob uma pressão de 25 cmH<sub>2</sub>O. A partir daí, o bloco coração-pulmão foi removido cirurgicamente. Para fixação desse bloco, os pulmões

foram imersos em formol a 10%. Com 24 h de fixação os espécimes, foram armazenados em etanol a 70% e, posteriormente, embebidos em parafina. A seguir, os tecidos foram armazenados em cápsulas com identificação dos subgrupos, processados, desidratados com álcool absoluto e xilol. Finalizando essa etapa, passaram ainda por duas cubas de parafina industrial. Em todo o processo os tecidos permaneceram em cada cuba por um período médio de uma hora e trinta minutos, em uma temperatura de 64 °C. Os tecidos, em processo de solidificação, foram imersos em parafina líquida para constituir pequenos blocos de parafina. Esses blocos foram modulados sobre uma estrutura de fórmica a partir de tacos de bronze. Formatados numa peça única, cada tecido mantinha sua identificação e foram resfriados em um recipiente com fundo contendo gelo. Na sequência, os blocos de parafina foram levados ao micrótomo (Leitz® 1512, Ernst Leitz, Vienna, Austria) para obtenção de cortes com espessura de cinco micrômetros (5,0 µm). As fatias das peças anatômicas foram submetidas a banho histológico a 50 °C, para que possibilitassem sua cobertura ao mesmo tempo em que estavam sendo preparadas lâminas com película fina contendo albumina, para sua fixação. O excesso de parafina das lâminas foi removido com aquecimento a 60 °C, por vinte minutos, no processador para tal finalidade. Na reidratação das lâminas foi utilizado banho com duas soluções de xilol, por cinco minutos, sendo elas passadas em três soluções consecutivas de álcool absoluto e banhadas ao final em água corrente. As colorações com Hematoxilina e Eosina (H & E) foram preparadas para a contagem dos septos interalveolares por análise morfométrica.

#### **5.4. Morfometria para Contagem dos Septos Interalveolares**

Para a análise morfométrica foram selecionados doze ratos de cada grupo, provenientes aleatoriamente dos diferentes subgrupos. Das lâminas obtidas, foram tiradas vinte fotos em campos aleatórios, com aumento de 100x. Essas fotos foram ajustadas a um eixo de coordenadas cartesianas (x,y) para a contagem dos septos interalveolares. Com essa

metodologia foi possível estabelecer a média de quantos septos interalveolares interceptavam uma linha com dimensão estabelecida. Esses valores foram comparados entre os obtidos das lâminas de pulmões de ratos normais com os pulmões de ratos tratados com elastase porcina. A contagem foi realizada por dois observadores cegados para os diferentes grupos. O resultado final representa a média da contagem dos dois diferentes observadores.

### **5.5. Análise da Vascularização do Enxerto**

Para a análise da vascularização, foram realizados cortes do enxerto de gordura livre autóloga e submetidos à coloração por H&E. Dois observadores cegados para os diferentes grupos analisaram 10 campos de 400 x, escolhidos aleatoriamente. O total de vasos observados resultou em uma média para cada animal. Os aglomerados de capilares foram considerados como vaso único.

### **5.6. Análise Imuno-histoquímica do Enxerto de Gordura Livre**

As lâminas preparadas para análise imuno-histoquímica – como previamente mencionado – foram obtidas de 06 ratos com pulmões normais e de 06 ratos com enfisema pulmonar experimental em cada subgrupo em períodos de observação de 7, 14, 21, 30, 60 dias. Essas lâminas foram lavadas, individualmente, por três vezes, por cinco minutos, e incubadas em peróxido de hidrogênio a 3,0% durante 10 minutos. Ao serem removidas da solução de peróxido de hidrogênio, novamente foram lavadas com água por cinco minutos, e por um tampão de lavagem por outros cinco minutos.

Para a análise, as lâminas foram submetidas a uma solução de bloqueio (100 µl) durante uma hora na temperatura ambiente do laboratório. O anticorpo primário foi diluído e incubado durante a noite a 4°C. A seguir, foram realizadas três lavagens individuais, por

três vezes, durante cinco minutos, com tampão de lavagem adicional de 100µl do anticorpo secundário diluído, seguidas por mais três lavagens individuais por cinco minutos. As lâminas foram montadas com solução de glicerina, apostas por lamínulas e refrigeradas no escuro. Para avaliação imuno-histoquímica, os espécimes foram marcados utilizando-se anticorpos monoclonais para Fator VIII de Von Willebrand (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup> Santa Cruz, CA), Fator de Crescimento Vascular Endotelial – VEGF (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup> Santa Cruz, CA) e Caspase 3 (Cell Signaling Technology<sup>®</sup>, Beverly, MA). A análise da expressão dos marcadores selecionados foi realizada através da utilização do software Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0 (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA), o qual permite a contagem dos *pixels* da coloração de interesse presentes na imagem. Foi utilizado um controle positivo para cada análise, com captura de 10 campos, fornecendo um valor médio para cada lâmina.

### **5.7. Análise Estatística**

Os dados foram armazenados em planilha eletrônica (Excel<sup>®</sup>, Microsoft Corporation, EUA) e a análise estatística foi efetuada com a utilização do pacote StatGraphics Plus 2.1 (Statistical Graphics Corporation-USA). As variáveis trabalhadas foram todas numéricas, discretas ou contínuas, e, para as comparações, foram utilizados testes paramétricos com médias – em especial Teste t de Student e Análise de variância (ANOVA). Adotou-se o nível de significância de 5,0% ( $p < 0,05$ ).

### **5.8. Ética em Pesquisa**

O trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas de Porto Alegre-RS (protocolo n.º. 08-247), em obediência às normas do “Guide for care and

use of laboratory animals” (National Institutes fo Health - NIH Publication NO. 86-23, revised 1985).

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Mortalidade na Série Experimental**

A mortalidade foi de 3 animais para cada grupo, ocorrida durante o ato operatório (n=3). No período após a cirurgia não foram constatadas mortes nos animais submetidos ao experimento, em nenhum dos dois grupos.

### **6.2. Integração Tecidual do Enxerto de Gordura Livre**

Ocorreu integração tecidual do enxerto de gordura livre autóloga obtida do epíplon e inserida nos pulmões em todos os animais do experimento, e em todos os diferentes tempos de observação – 7, 14, 21, 30 e 60 dias (Figura 5).

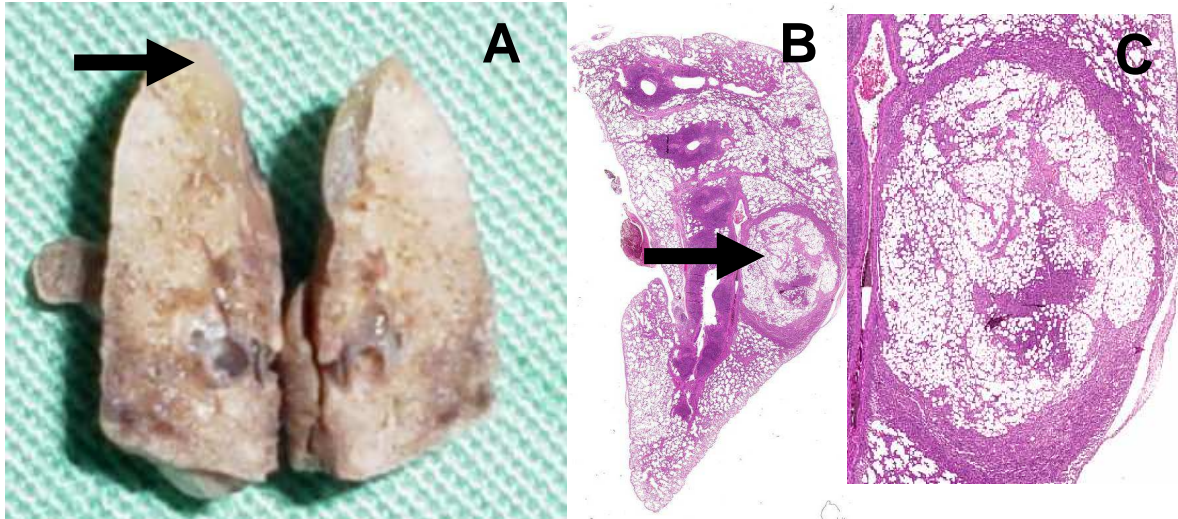


Figura 5. A: espécime fixado em formol, com enxerto de gordura em parênquima pulmonar (seta); B: corte H&E com vista lateral do pulmão e enxerto de gordura livre (seta) (100x); C: Corte transversal do enxerto de gordura livre obtida do epíplon, onde se observam os limites do enxerto e sua integração ao tecido pulmonar (lâminas obtidas 7 dias após o implante) (400x).

### 6.3. Contagem do Número de Septos Interalveolares

Observou-se uma redução significativa do número de septos interalveolares no grupo de animais portadores de enfisema induzido pela administração intrapulmonar de elastase pancreática porcina. Os índices foram obtidos através da contagem dos septos em lâminas coradas pela H&E sob eixos cartesianos em 9 animais por grupo (Figura 6). No grupo enfisema, o número de septos foi significativamente menor ( $p < 0,001$ ) (Figura 7).

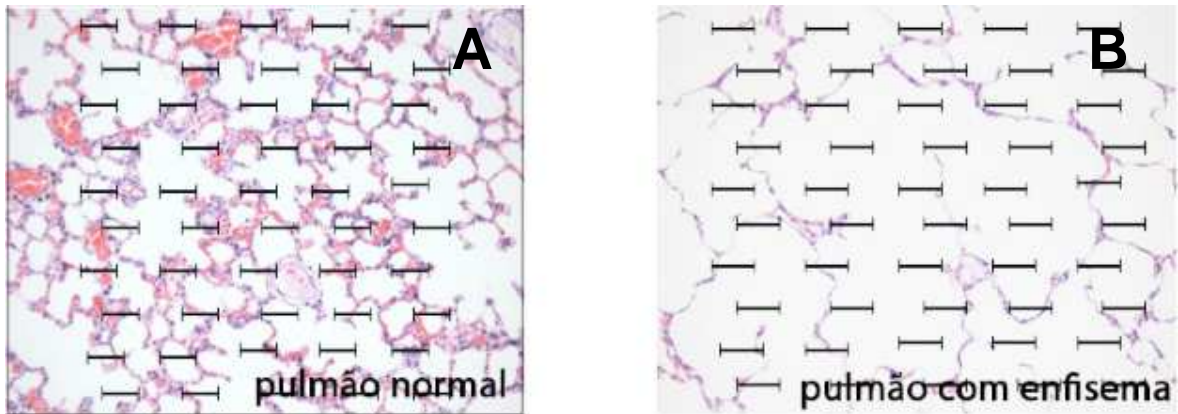


Figura 6. Imagem representativa da morfometria realizada para contagem de septos interalveolares em pulmão normal (A), pulmão com enfisema experimental (B). Coloração H&E.

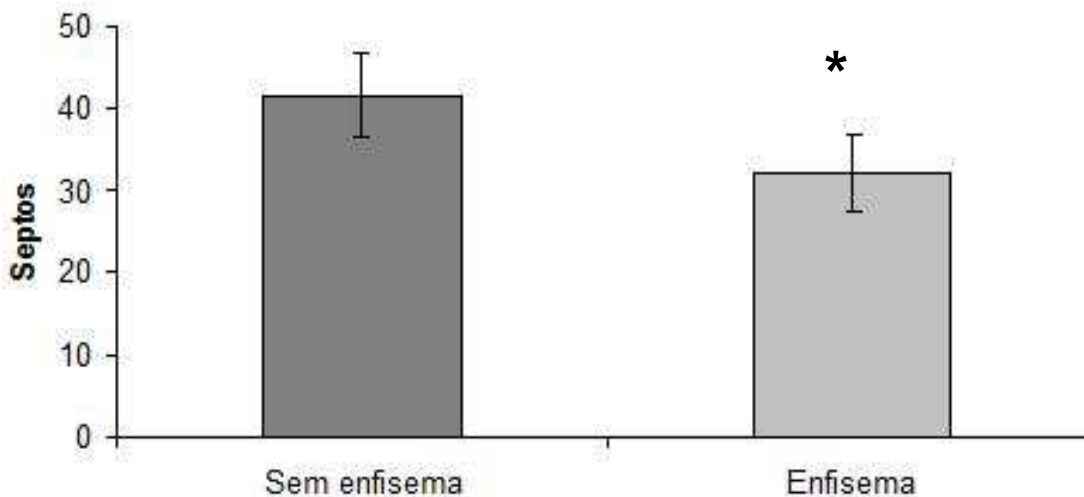


Figura 7. Contagem de septos em pulmão normal e em pulmão com enfisema. (n= 9 animais por grupo) (\*P < 0,001)

## 6.4. Vascularização e Perfusão do Enxerto de Gordura Livre Autóloga

### 6.4.1. Contagem do número de vasos no enxerto de gordura livre

Não houve diferença significativa na contagem de vasos no interior do enxerto de gordura livre autóloga entre aos 7 e aos 60 dias do implante do enxerto. A análise vascularização do enxerto de gordura foi efetuada pela contagem média do número de vasos encontrados no enxerto. Aos 7 dias da enxertia, observou-se  $9,25 \pm 4.5$  vasos nos



pulmões normais, e  $6,17 \pm 2,52$  vasos nos pulmões com enfisema. Aos 14 dias da enxertia esse número foi de  $9,75 \pm 2,99$  vasos para os ratos com pulmões normais e de  $8,25 \pm 3,72$  vasos para aqueles portadores de enfisema. Aos 21 dias, foram de  $14,08 \pm 2,84$  vasos em pulmões normais, e  $8,33 \pm 3,23$  vasos nos com enfisema. Aos trinta dias, as contagens foram de  $11,25 \pm 2,53$  vasos para os pulmões normais, e de  $8,50 \pm 3,18$  vasos para os com enfisema. Completados 60 dias da enxertia o número de vasos para os pulmões normais foi de  $8,42 \pm 2,84$ , e de  $5,83 \pm 2,69$  vasos para os pulmões com enfisema.

#### 6.4.2. Perfusão com Tinta da China

Foi observada a presença de vasos corados pela Tinta da China nos enxertos de gordura livre de todos os animais estudados nos diferentes períodos de observação em ambos os grupos (Figura 8).

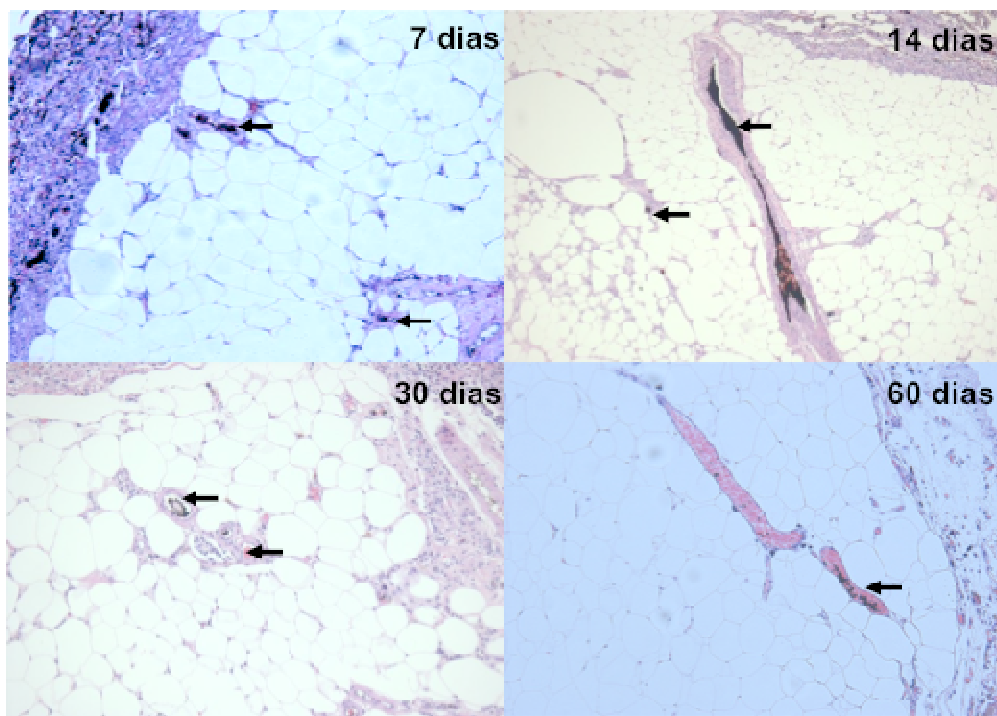


Figura 8. Amostras representativas em H&E de pulmões de ratos com enfisema, demonstrando a presença de vasos corados com Tinta da China (setas) em enxertos de gordura livre em diferentes períodos de observação (200X).

## 6.5. Análises Imuno-histoquímicas no Enxerto de Gordura Livre

### 6.5.1. Análise Imuno-histoquímica para Fator VIII

A análise imuno-histoquímica com fator VIII para avaliação de neo-vascularização mostrou os seguintes achados: aos 30 e 60 dias, a densidade vascular no enxerto de gordura implantado em pulmões com enfisema foi maior ( $70,09 \pm 5,71$  e  $68,79 \pm 5,3$  vasos), em comparação com a encontrada nos períodos anteriores nos subgrupos do enfisema. A densidade Vascular também foi maior para os subgrupos dos 30 e 60 dias com pulmões normais ( $34,12 \pm 5,3$  e  $34,27 \pm 5,49$  vasos), respectivamente (Tabela I e Figuras 9,10).

Tabela I – Expressão do Fator VIII por análise imuno-histoquímica.

Tempo	Normal	Enfisema	p
7 dias	34,52±7,45	33,48±6,41	ns
14 dias	37,39±8,31	34,12±5,03	ns
21 dias	36,62±6,39	34,27±5,49	ns
30 dias	32,74±6,16	70,09±5,71	< 0,001
60 dias	33,67±5,46	68,79±5,3	< 0,001

Número de *pixels* corados para Fator VIII em ratos normais e ratos com enfisema nos diferentes tempos de avaliação. (ns = não significativo).

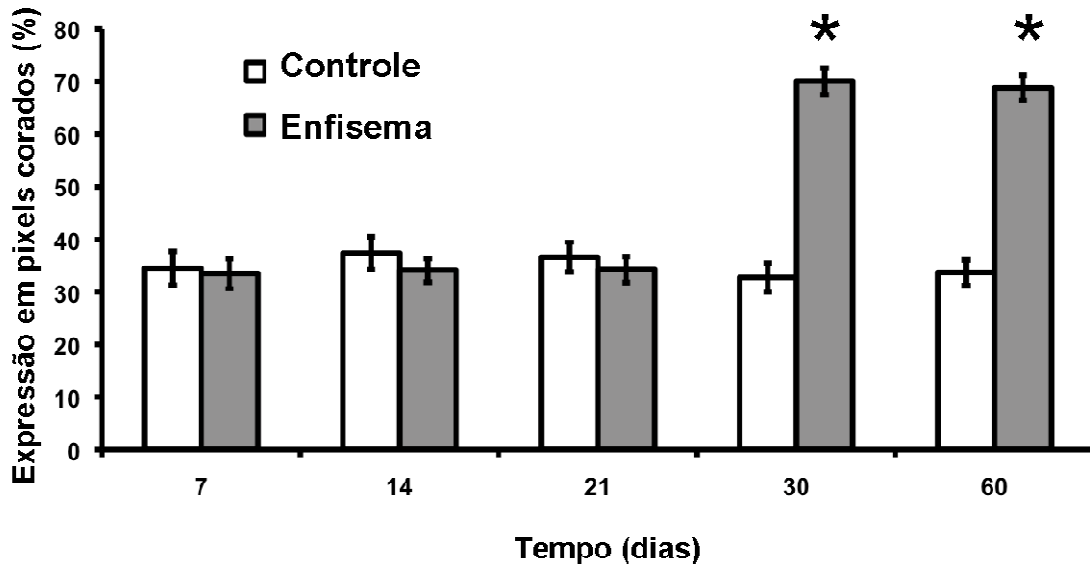


Figura 9. Análise da densidade vascular através da porcentagem de *pixels* corados pela imuno-histoquímica para o fator VIII. No eixo horizontal, os grupos com e sem enfisema em seus diferentes períodos de avaliação; no eixo vertical, a positividade para fator VIII. (\* $p < 0,0001$ )

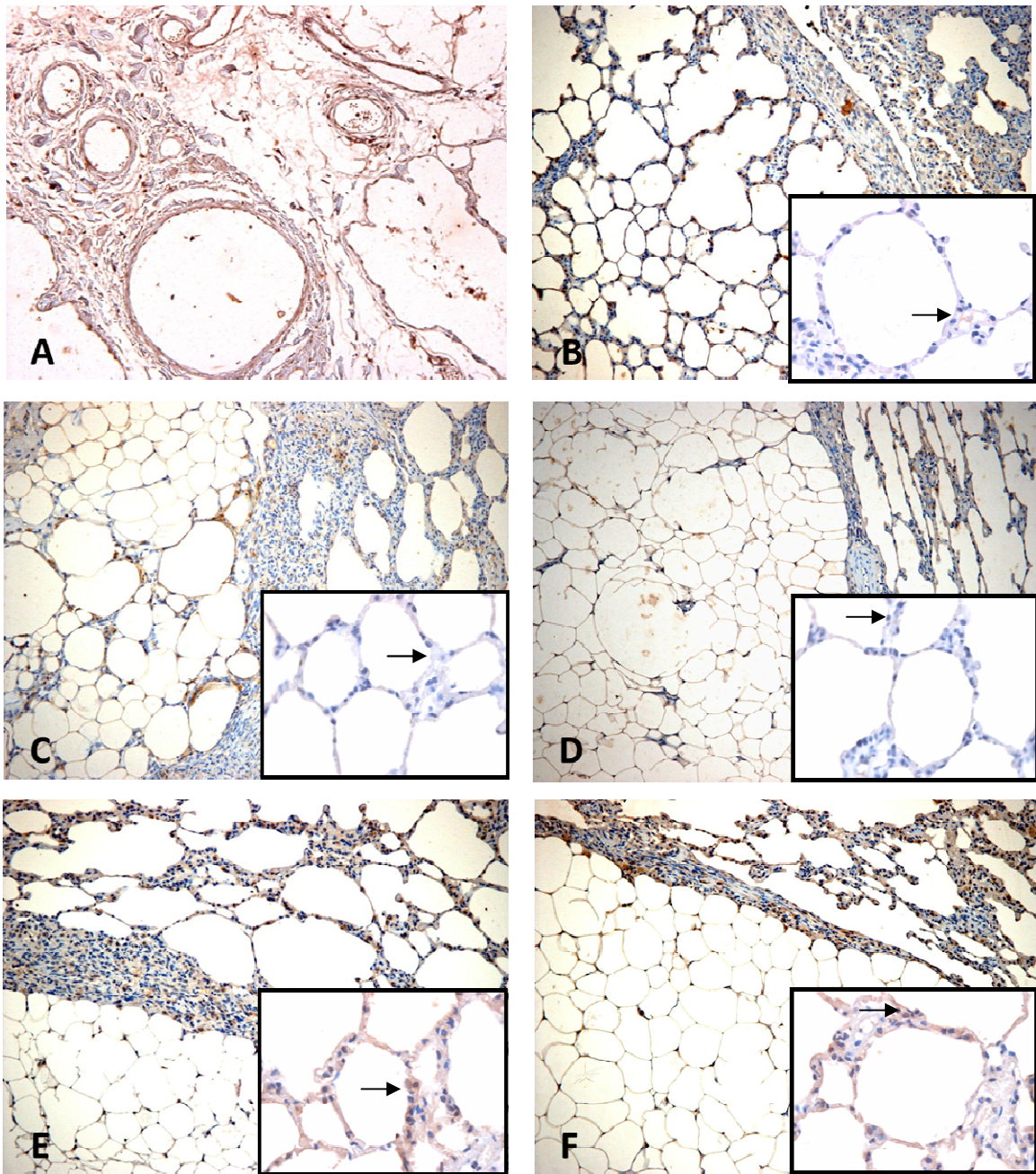


Figura 10. Análise Imuno-histoquímica para Fator VIII nos pulmões com enfisema e enxerto de gordura livre. A – Controle Positivo; B – Enfisema 7 dias; C – Enfisema 14 dias; D – Enfisema 21 dias; E – Enfisema 30 dias; F – Enfisema 60 dias. As setas indicam células positivas para Fator VIII nos diferentes períodos de observação.

### 6.5.2. Imuno-histoquímica para VEGF

A avaliação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), por método imuno-histoquímico, confirmou a presença deste fator no enxerto de gordura livre autóloga estudado, com aumento significativo da expressão do mesmo em todos os

tempos estudados nos pulmões enfisematosos quando comparados aos pulmões normais ( $p < 0,001$ ). Em 30 e 60 dias houve uma diminuição significativa da expressão de VEGF quando comparado aos períodos iniciais ( $p < 0,001$ ) (Tabela II e Figuras 11,12).

Tabela II. Análise da expressão do VEGF por imuno-histoquímica.

Tempo	Normal	Enfisema	p
7 dias	12,59+0,38	38,34+1,46	<0,001
14 dias	11,99+0,58	39,58+1,44	<0,001
21 dias	12,95+1,40	36,61+0,33	<0,001
30 dias	12,79+0,02	33,61+0,33	<0,001
60 dias	12,11+0,43	26,00+1,66	<0,001

Média de *pixels* corados para fator VIII em ratos com e sem enfisema nos diferentes períodos de avaliação.

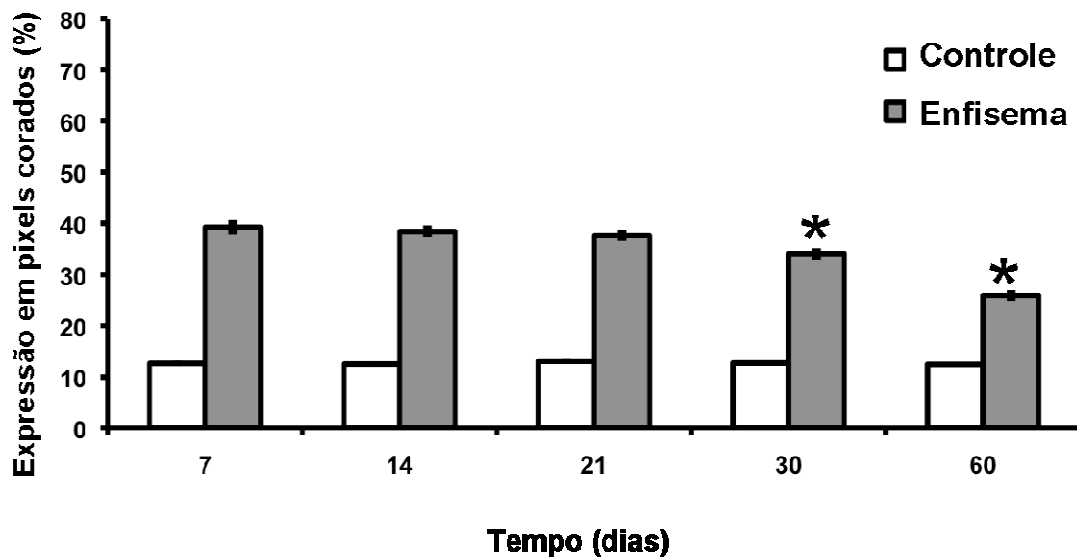


Figura 11. Análise da porcentagem de *pixels* corados pela imuno-histoquímica para VEGF. No eixo horizontal, os grupos com e sem enfisema em seus diferentes períodos de avaliação; no eixo vertical a positividade para VEGF). Aumento significativo da expressão de VEGF em todos os períodos de observação com relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Em 30 e 60 dias houve diminuição significativa da expressão de VEGF no grupo enfisematoso com relação aos períodos iniciais (\* $p < 0,001$ ).

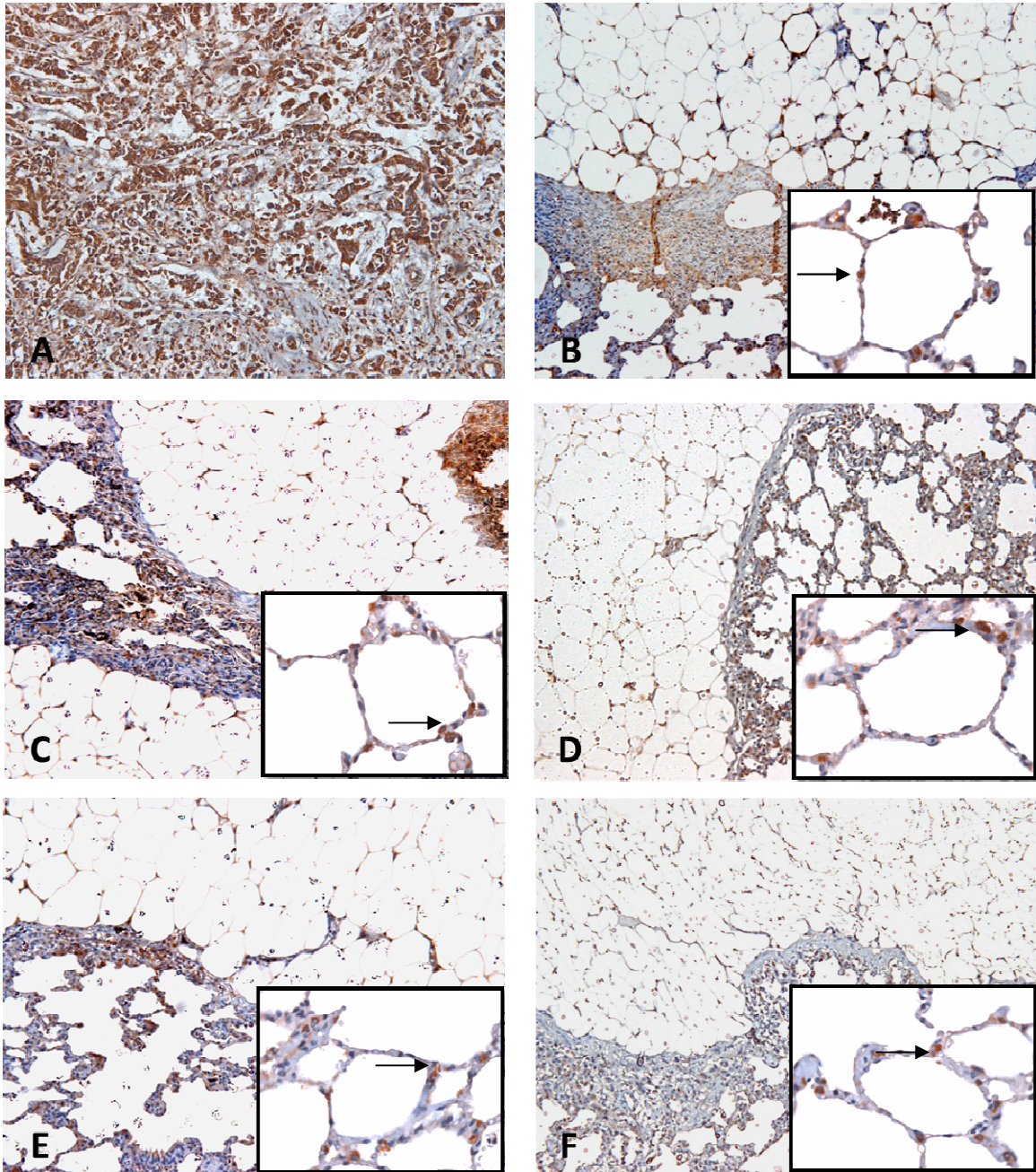


Figura 12: Análise imuno-histoquímica do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) nos pulmões submetidos ao enfisema com o enxerto de gordura. A – Controle Positivo; B – Enfisema 7 dias; C – Enfisema 14 dias; D – Enfisema 21 dias; E – Enfisema 30 dias; F – Enfisema 60 dias. As setas indicam células positivas para VEGF nos diferentes períodos de observação.

### 6.5.3. Imuno-histoquímica para apoptose (caspase 3)

Não foram observadas alterações na expressão da caspase 3 em todos os tempos avaliados no grupo de pulmão normal, e em 7 e 14 dias no grupo enfisema. No entanto, houve um aumento significativo na expressão desta enzima após os períodos de 30 e 60

dias em pulmões com enfisema quando comparados a todos os tempos do grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Tabela III e Figuras 13,14). A expressão de caspase-3 no grupo enfisema encontrava-se, em 21 dias, significativamente aumentada em relação a 7, 14, 21 e 30 dias do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Tabela III. Média de *pixels* corados para caspase-3 em ratos com e sem enfisema nos diferentes períodos de avaliação.

Tempo	Normal	Enfisema	p
7 dias	12,66+2,31	16,69+2,89	ns
14 dias	13,08+1,64	15,39+3,39	ns
21 dias	12,98+2,32	18,91+5,75	ns
30 dias	12,52+1,98	34,13+2,71	<0,001
60 dias	13,84+2,54	37,61+3,16	<0,001

(ns = não significativo).

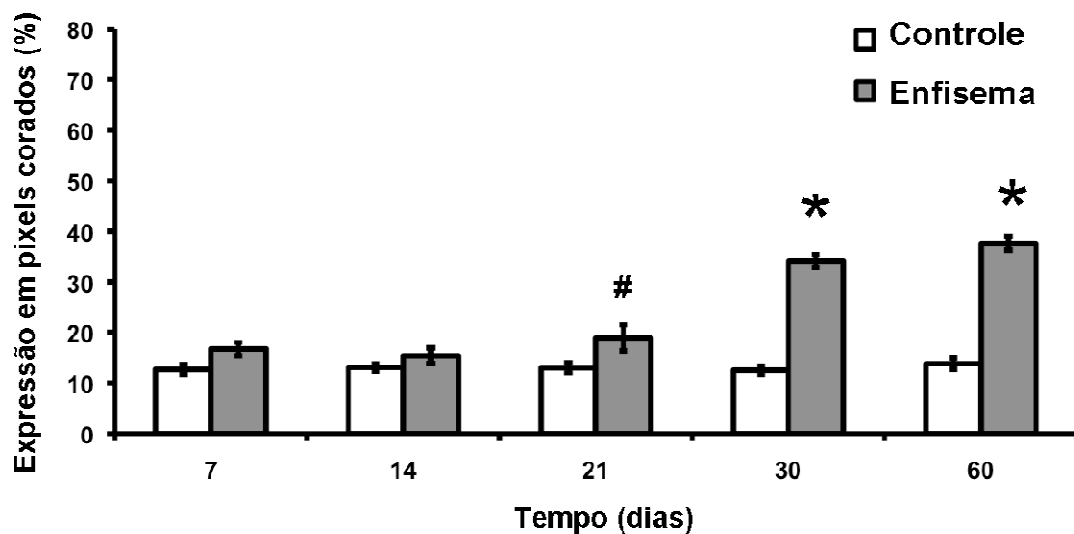


Figura 13. Análise da porcentagem de *pixels* corados pela imuno-histoquímica para caspase-3. No eixo horizontal, os grupos com e sem enfisema em seus diferentes períodos de avaliação; no eixo vertical, a positividade para a caspase-3. Aumento significativo na expressão de caspase-3 nos subgrupos de 30 e 60 dias em pulmões com enfisema quando comparados a todos os tempos do grupo controle ( $*p < 0,001$ ). Aumento significativo da expressão da caspase-3 em 21 dias no grupo enfisema em relação a 7, 14, 21 e 30 dias do grupo controle ( $\#p < 0,05$ ).

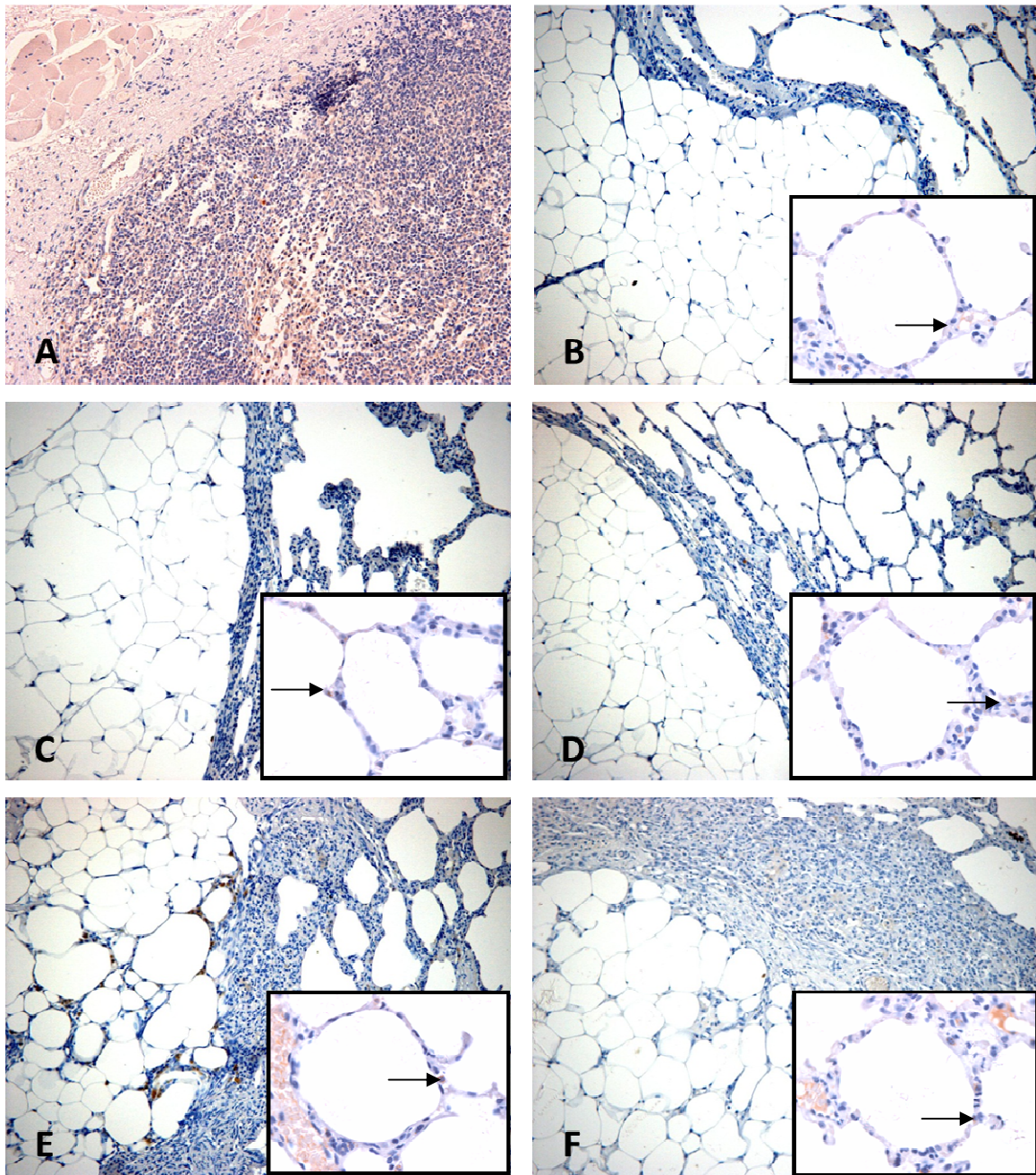


Figura 14: Análise Imuno-histoquímica da Caspase-3 nos pulmões submetidos ao enfisema com o enxerto de gordura. A – Controle Positivo; B – Enfisema 7 dias; C – Enfisema 14 dias; D – Enfisema 21 dias; E – Enfisema 30 dias; F – Enfisema 60 dias. As setas indicam células positivas para caspase-3 nos diferentes períodos de observação

## 7. DISCUSSÃO

Este estudo demonstra, pela primeira vez na literatura, a ocorrência da integração e a viabilidade do enxerto de gordura livre autóloga no parênquima pulmonar transcorridos 60 dias de seu implante em ratos com pulmão normal e em ratos com enfisema pulmonar induzido experimentalmente por instilação de elastase pancreática porcina. Além disso o uso de gordura livre autóloga conseguiu impedir o escape de ar tanto de pulmões normais como nos enfisematosos neste modelo de perfuração pulmonar.

O modelo de enfisema simula o desafio que defrontamos na prática clínica ao controlar o escape de ar em pacientes portadores de enfisema submetidos à ressecção pulmonar. A procura por um material aerostático nas ressecções pulmonares tem motivado o interesse dos cirurgiões torácicos. Apesar dos avanços tecnológicos em materiais aerostáticos, o selante ideal ainda está para ser definido (Pinto Filho DR, 2003). A gordura autóloga tem merecido estudos recentes pela sua facilidade de aplicação e maior aceitabilidade do ponto de vista de compatibilidade tecidual, além de constituir um excelente modulador experimental para tratamento do enfisema pulmonar (Shigemura N et al., 2006; Warburton, D. et al., 2008)

A utilização clínica de enxerto de gordura livre autóloga tem sido relatada em neurocirurgia para tratamento de fístula liquórica (Landeiro JÁ et al., 2004) e, também, em cirurgia da cabeça e pescoço para tratamento da paralisia de prega vocal (Zaretsky LS et al., 1995). Estudos utilizando esta estratégia têm sido descritos em cirurgia plástica reconstrutora com transplante de células de tecido adiposo para preenchimento de deformidades superficiais com finalidades estéticas ou até mesmo funcionais (Tran TT & Kahn CR, 2010). O principal problema com tal técnica consiste na gradual diminuição nas



dimensões do enxerto com o passar do tempo. Essa progressiva redução é provavelmente uma consequência da necrose e da apoptose das células adiposas (Iyama K ET AL., 1979).

Nishimura e colaboradores tentaram explicar este fenômeno utilizando enxerto de gordura livre no dorso de ratos adultos. Estes autores verificaram que durante os primeiros quatro dias a viabilidade do enxerto foi mantida por osmose. Posteriormente, a angiogênese iniciou a partir da liberação do fator de crescimento endotelial vascular, desencadeado por estímulo de hipóxia. Esta cascata de eventos resultou na revascularização do enxerto. Os mesmos autores demonstraram que, após trinta dias, houve uma redução no estímulo do VEGF, levando a uma redução de tamanho no enxerto por mecanismos mediados por apoptose (Nishimura T et al., 2000).

Em nosso estudo, a neovascularização do enxerto de gordura livre autóloga foi observada aos 7 dias, após a injeção da gordura no parênquima pulmonar, promovendo a preservação tecidual e a manutenção da viabilidade do enxerto. Utilizando análise imunohistoquímica pela caspase 3, nós observamos um progressivo aumento na atividade apoptótica no grupo de enfisema iniciado aos 21 dias. Uma vez que este modelo de enfisema pulmonar causa destruição progressiva dos septos alveolares, a elastase porcina poderia, de alguma forma, também interferir no metabolismo ou viabilidade da gordura, levando a um aumento da apoptose, o que poderia resultar em uma redução no tamanho do enxerto. Somando-se a isto, a hipóxia associada ao pobre estado nutricional das células adiposas enxertadas nos pulmões com enfisema poderiam ser responsáveis pelo aumento da expressão apoptótica nestas células em períodos mais prolongados, uma vez que tais condições associadas poderiam desencadear apoptose (Iyama K et al., 1979).

Observamos que a expressão de VEGF no enxerto de gordura livre foi constantemente mais elevada em pulmões enfisematosos quando comparada aos pulmões normais em todos os períodos da observação. No entanto, houve uma diminuição

progressiva e significativa da expressão de VEGF no enxerto iniciada aos trinta dias. Curiosamente, esse achado contrasta com o aumento gradual da expressão do Fator VIII neste mesmo período. (Figura 15) Estas observações, provavelmente, representam uma diminuição do estímulo angiogênico representado pela menor expressão de VEGF em troca a um aumento da densidade vascular caracterizada pela significativa elevação na expressão do Fator VIII. A constante elevação da expressão do VEGF no enxerto de gordura no grupo enfisema pode ser o resultado das condições teciduais locais, representado por um aumento da demanda de oxigênio, o que favoreceria a síntese de fatores de crescimento e, conseqüentemente, um maior estímulo para neo-vascularização (Nishimura T et al., 2000).

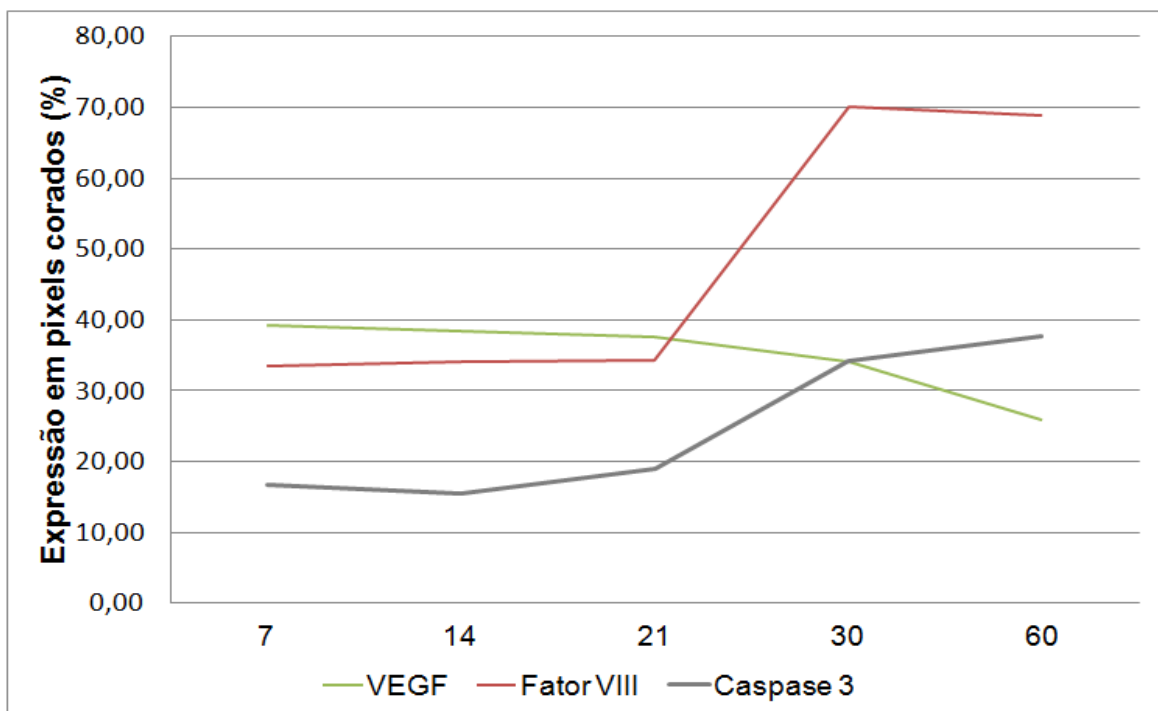


Figura 15: Análise gráfica dos marcadores imuno-histoquímicos nos diferentes tempos de observação no grupo enfisema pulmonar.

Yoshimura e colaboradores utilizaram enxerto de gordura pericárdica pediculada como uma alternativa barata e eficaz para controlar escape de ar em ressecções pulmonares parciais (Yoshimura M et al., 2002). Matsumoto e colaboradores mostraram que a utilização de enxerto de gordura livre obtida do pericárdio foi efetiva na prevenção de escape de ar em pulmões de quatro cães que foram submetidos a uma laceração pulmonar de 2 cm. Isto permitiu a remoção do dreno pleural imediatamente após o fechamento da parede torácica, sem que constatassem escape de ar ou outras complicações pleurais nos animais estudados. Passados trinta dias da implantação, uma análise macroscópica mostrou que o enxerto de gordura livre permanecia acoplado a superfície do pulmão (Matsumoto I et al., 2005). Na sequência, os autores realizaram um estudo clínico - em 23 pacientes, utilizando essa técnica em ressecções pulmonares por neoplasia -, no qual verificaram nítida redução nos índices de escape de ar no transoperatório, com uma significativa redução na permanência dos drenos pleurais. Com um tempo maior de observação que o apresentado por Matsumoto, mostramos que em 60 dias o enxerto de gordura livre permanecia acoplado ao parênquima pulmonar, era facilmente identificado e neovascularizado aos 7 dias.

Tem sido mostrado que o tecido adiposo contém uma população de células tronco mesenquimais adultas com propriedades regenerativas. Tais propriedades seriam uma alternativa para a liberação de células estromais derivadas do tecido adiposo para os tecidos pulmonares lesados (Matsumoto I et al., 2005). Estudos experimentais prévios mostraram que essas células, quando infundidas intravenosamente ou preparadas em lâminas de ácido poliglicólico e aderidas em pulmões enfisematosos de ratos submetidos a cirurgias de redução de volume pulmonar, tinham a habilidade de estimular a regeneração pulmonar através da síntese de fatores de crescimento, especialmente do Fator de Crescimento de Hepatócitos (FCH) (Shigemura N et al., 2006). Além disso, os

encorajadores resultados histológicos e moleculares, mostrando melhora na troca de gases e na capacidade de exercício, sugerem que essas células possam ter algum papel no tratamento do enfisema. Embora não tenhamos estudado as potenciais aplicações regenerativas do enxerto de gordura livre no parênquima pulmonar, sua utilização poderia ter benefício regenerativo em pulmões com enfisema (Warburton, D. et al., 2008).

Nosso estudo certamente tem limitações. As lesões pulmonares provocadas não representam, de fato, o que se observa em situações clínicas. Todavia, a demonstração da viabilidade dos enxertos de gordura livre e seus possíveis mecanismos e benefícios pode abrir caminho para testes em animais maiores, ou mesmo para estudos clínicos. Nosso estudo mostrou em modelo de animais de pequeno porte que o uso de enxertos de gordura peritoneal livre é efetivo no controle do escape de ar pulmonar; trouxe, ainda, importantes informações sobre a eficácia do uso de enxerto de gordura livre autóloga em pulmões de ratos normais e com enfisema, que podem ser importantes para estudos futuros.

## 8. CONCLUSÕES

- Foi possível desenvolver um método cirúrgico de aerostasia pulmonar transoperatória utilizando enxerto de gordura livre autóloga do epíplon.
- Mostrou-se que a instilação intra-traqueal de elastase porcina em ratos acabava desencadeando enfisema pulmonar ou alterações alveolares semelhantes às do enfisema observado em humanos;
- O enxerto de gordura livre autóloga do epíplon mostrou-se exequível e eficaz como método de aerostasia pulmonar, pós-trauma penetrante periférico transoperatório, igualmente em ratos normais e com enfisema induzido.
- Houve integração dos enxertos de gordura livre autóloga peritoneal no parênquima pulmonar, mostrando-se viáveis e neovascularizados em todos os períodos de observação.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta de se produzir um modelo de aerostasia pulmonar a partir de gordura livre autóloga contou com o embasamento clínico de observações bem-sucedidas, por mais de dez anos, na cirurgia torácica e nos transplantados de pulmão. Houve a necessidade de se reproduzir em modelo animal a viabilidade tecidual, até mesmo para ampliar o espectro de conhecimentos numa área pouco conhecida da aerostasia pulmonar.

Os bem-sucedidos enxertos de gordura livre autóloga aplicados em estudos clínicos são bem conhecidos em outras áreas da cirurgia. O temor da necrose e possível infecção foram afastados por estas observações clínicas e minimizados, quem sabe, pelo reduzido tamanho do enxerto empregado nestes estudos. O passo seguinte foi dado pela cirurgia plástica, em que o tamanho do enxerto superou o de outras especialidades, permitindo que enxertos maiores fossem empregados em cirurgia estética e reconstrutiva. Inicialmente, o tamanho do enxerto superou as expectativas. A evolução apoptótica, no entanto, reduziu seu tamanho, comprometendo o resultado estético ou funcional para que fora enxertado. No âmbito da cirurgia pulmonar, o enxerto de gordura pediculado já é usado rotineiramente com resultados muito seguros. O pedículo com o suprimento vascular garante uma viabilidade sustentável. Uma grande dificuldade está no comprimento do pedículo vascular da gordura da região pericárdica, não podendo ser estendido ao pulmão como um todo.

O trabalho experimental e a observação em estudo clínico, realizados por Matsumoto e colaboradores, em 2005, mostraram que a gordura livre da região pericárdica pode ser utilizada em pulmões de cães e humanos. Mostraram, em uma observação de trinta dias, que o enxerto é eficaz para controle do escape de ar dos pulmões no transoperatório e que estava integrado ao parênquima pulmonar no final dos trinta dias. A

questão seguinte estava na constatação de viabilidade tecidual do enxerto de gordura livre. Nosso estudo foi direcionado neste sentido e na observação por um período de sessenta dias, o dobro do estudo inicial com enxerto de gordura livre autóloga. Surpreendentemente, há vascularização em todos os períodos observados, dos 7 aos 60 dias, como mostram os testes de perfusão com Tinta da China. A atividade apoptótica é bem conhecida e se mostrou significativa aos trinta dias da enxertia de gordura livre. Esta atividade é até desejável na cirurgia pulmonar, em que predomínio de enfisema e câncer de pulmão, primário ou não, necessitam de acompanhamento radiológico após as ressecções pulmonares. Assim, com a diminuição do tamanho do enxerto, um simples acompanhamento com raio-x de tórax, por exemplo em ressecções metastáticas, conseguiríamos diferenciar o que é doença expansível metastática da gordura livre que passa a ter redução de tamanho quando comparadas às imagens radiológicas. O temor de necrose no enxerto de gordura livre e as suas consequências podem ser afastados pela presença de perfusão no enxerto já em períodos bem iniciais, além de servir aos propósitos aerostáticos a que é proposto. Além da expectativa de coibir o escape de ar dos pulmões após as ressecções pulmonares parciais, é surpreendente que a gordura livre assim alocada possa ter outra atividade benéfica para os pulmões, representada pelas células estromais, com capacidade regenerativa pulmonar justamente nesse grupo de pacientes onde o enfisema predomina.

Inicialmente pensamos no enxerto de gordura livre com finalidade aerostática e ele se mostrou exequível, eficaz e viável. Foi além disso, permitindo um leque de possibilidades para estudos futuros, como por exemplo na definição do tamanho do enxerto, na técnica cirúrgica como agente aerostático, ou como uma possibilidade de agente restaurador de pulmões acometidos por enfisema.

## 10. REFERÊNCIAS

Abolhoda A, Liu D, Brooks A, Burt M, Incidence and Possible Risk Factors Upper Lobectomy : An Analysis of Prolonged Air Leak Following Radical1998;113;1507-1510 Chest

Balsara KR, Balderson SS, D'Amico TA. Surgical techniques to avoid parenchymal injury during lung resection (fissureless lobectomy). *Thorac Surg Clin* 2010; 20(3):365-9.

Brunelli A. Preface. Air leak after pulmonary resection. *Thorac Surg Clin*.2010; 20(3):xi.

Brunelli A, Cassivi SD, Halgren L. Risk factors for prolonged air leak after pulmonary resection. *Thorac Surg Clin* 2010; 20(3):359-64.

Brunelli A, Monteverde M, Borri A, Salati M, Marasco RD, Fianchini A. Predictors of prolonged air leak after pulmonary lobectomy. *Ann Thorac Surg* 2004; 77(4): 1205-10; discussion 10.

Camargo JJ, Pinto Filho DR. Tópicos de Atualização em Cirurgia Torácica: cap 6.3 Recuperação Funcional, SBCT, 2011.

Cerfolio RJ, Bass CS, Pask AH, Katholi CR. Predictors and treatment of persistent air leaks. *Ann Thorac Surg* 2002; 73(6):1727-30; discussion 30-1.

Cerfolio RJ, Bryant AS. The management of chest tubes after pulmonary resection. *Thorac Surg Clin* 2010; 20(3):399-405.

Cerfolio RJ, Maniscalco L, The Treatment of Patients with Stage IIIA Non- Small Cell Lung Cancer From N2 Disease: Who Returns to the Surgical Arena and Who Survives. *Ann Thorac Surg* 2008;86:912–20

Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg* 1995; 19(5):421-5.

Cohen G M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* (1997) 326, 1±16  
Cooper JD, Trulock EP, Triantafillou AN, Patterson GA, Pohl MS, Deloney PA, et al. Bilateral pneumectomy (volume reduction) for chronic obstructive pulmonary disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109(1):106-16; discussion 16-9.

DeCamp MM, Blackstone EH, Naunheim KS, Krasna MJ, Wood DE, Meli YM, et al. Patient and surgical factors influencing air leak after lung volume reduction surgery: lessons learned from the National Emphysema Treatment Trial. *Ann Thorac Surg* 2006; 82(1):197-206; discussion -7.



Derek P. Nathan, Nyali E. Taylor, David W. Low, Daniel Raymond and Joseph B. Shrager Pneumothorax Thoracoscopic Total Parietal Pleurectomy for Primary Spontaneous 2008;85:1825-1827 Ann Thorac Surg

Droghetti A, Schiavini A, Muriana P, Comel A, De Donno G, Beccaria M, et al. Autologous blood patch in persistent air leaks after pulmonary resection. J Thorac Cardiovasc Surg 2006; 132(3):556-9.

Droghetti A, Schiavini A, Muriana P, Folloni A, Picarone M, Bonadiman C, et al. A prospective randomized trial comparing completion technique of fissures for lobectomy: stapler versus precision dissection and sealant. J Thorac Cardiovasc Surg 2008; 136(2):383-91.

Dusmet M, Winton TL, Kesten S, Maurer Previous intrapleural procedures do not adversely affect lung transplantation. J Heart Lung Transplant. 1996Mar;15(3):249-54

Dutly AE, Andrade CF, Verkaik R, Kugathasan, Trogadis J, Liu M, A novel model for post-transplant obliterative airway disease reveals angiogenesis from the pulmonary circulation. Am J Transplant 2005;5:248–254

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis Am J Physiol Cell Physiol 280:C1358-C1366, 2001.

Giacomo T, Rendina EA, Venuta F, Francioni F, Moretti M, Pugliese F, Pneumoperitoneum for the Management of Pleural Air Space Problems Associated With Major Pulmonary Resections. Ann Thorac Surg 2001;72:1716 –9

Gomez-Caro A, Calvo MJ, Lanzas JT, Chau R, Cascales P, Parrilla P. The approach of fused fissures with fissureless technique decreases the incidence of persistent air leak after lobectomy. Eur J Cardiothorac Surg 2007; 31(2):203-8.

Iyama K, Ohzono K, Usuku G. Electron microscopical studies on the genesis of white adipocytes: differentiation of immature pericytes into adipocytes in transplanted preadipose tissue. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1979; 31(2):143-55.

Kobayashi H, Sekine T, Nakamura T, Shimizu Y. In vivo evaluation of a new sealant material on a rat lung air leak model. J Biomed Mater Res. 2001;58(6):658-65.

Kodama K, Doi O, Higashiyama M, Yokouchi H. Pneumostatic effect of gelatin-resorcinol formaldehyde-glutaraldehyde glue on thermal injury of the lung: an experimental study on rats. Eur J Cardiothorac Surg 1997; 11(2):333-7.

Lackey A, Mitchell JD. The cost of air leak: physicians' and patients' perspectives. Thorac Surg Clin 2010; 20(3):407-11.

Landeiro JA, Lazaro B, Melo MH. Endonasal endoscopic repair of cerebrospinal fluid rhinorrhea. *Minim Invasive Neurosurg* 2004; 47(3):173-7.

Lee L, Hanley SC, Robineau C, Sirois C, Mulder DS, Ferri LE. Estimating the risk of prolonged air leak after pulmonary resection using a simple scoring system. *J Am Coll Surg*. 2011 Jun;212(6):1027-32. Epub 2011 Apr 13

Matsumoto I, Ohta Y, Oda M, Tsunozuka Y, Tamura M, Kawakami K, et al. Free pericardial fat pads can act as sealant for preventing alveolar air leaks. *Ann Thorac Surg* 2005; 80(6):2321-4.

Mahzouni P, Mohammadzadeh F, Mougouei K, Moghaddam NA, Chehrei A, Mesbah A. Determining the relationship between "microvessel density" and different grades of astrocytoma based on immunohistochemistry for "factor VIII-related antigen" (von Willebrand factor) expression in tumor microvessels. *Indian J Pathol Microbiol* 2010;53:605-10

Merritt RE, Singhal S, Shrager JB. Evidence-based suggestions for management of air leaks. *Thorac Surg Clin* 2010; 20(3):435-48.

Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ayabe H, Ferdman A, Cooper JD. Improved bronchial healing in canine left lung reimplantation using omental pedicle wrap. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 85(1):134-9.

Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ferdman A, Luk SK, Cooper JD. Successful revascularization of totally ischemic bronchial autografts with omental pedicle flaps in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982; 84(2):204-10.

Murray KD, Ho CH, Hsia JY, Little AG. The influence of pulmonary staple line reinforcement on air leaks. *Chest*. 2002;122(6):2146-9.

Murthy SC. Air leak and pleural space management. *Thorac Surg Clin* 2006; 16(3):261-5.

Ng T, Ryder BA, Machan JT, Cioffi WG. Decreasing the incidence of prolonged air leak after right upper lobectomy with the anterior fissureless technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 139(4):1007-11.

Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *Laryngoscope* 2000; 110(8):1333-8.

Ono M, Sawa Y, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Matsuda H. In vivo gene transfection with hepatocyte growth factor via the pulmonary artery induces angiogenesis in the rat lung. *Circulation* 2002; 106: I261–I269.

Pinto Filho, Darcy Ribeiro. Estudo sobre a eficácia da aerostasia pulmonar, em modelo animal, utilizando diferentes tipos de suturas. *J. Pneumologia* 2003; 29: 295-301

Raymundo MM. Os Deveres dos Pesquisadores para com os Animais de Experimentação: uma proposta de auto-regulamentação . Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000

Rice TW, Blackstone EH. Use of sealants and buttressing material in pulmonary surgery: an evidence-based approach *Thorac Surg Clin* 2010; 20(3):377-89.

Roberson LD, Netherland DE, Dhillon R, Heath BJ. Air leaks after surgical stapling in lung resection: a comparison between stapling alone and stapling with staple-line reinforcement materials in a canine model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116(2):353-4.

Rocco G. Intraoperative measures for preventing residual air spaces. *Thorac Surg Clin* 2010; 20(3):371-5.

Rivera C, Bernard A, Falcoz PE, Thomas P, Schmidt A, Bénard S, Vicaut E, Dahan M. Characterization and prediction of prolonged air leak after pulmonary resection: a nationwide study setting up the index of prolonged air leak. *Ann Thorac Surg*. 2011 Sep;92(3):1062-8; discussion 1068.

Sanchez PG, Vendrame GS, Madke GR, Pilla ES, Camargo Jde J, Andrade CF, et al. Lobectomy for treating bronchial carcinoma: analysis of comorbidities and their impact on postoperative morbidity and mortality. *J Bras Pneumo* 2006; 32(6):495-504.

Shigemura N, Okumura M, Mizuno S, Imanishi Y, Nakamura T, Sawa Y. Autologous transplantation of adipose tissue-derived stromal cellsameliorates pulmonary emphysema. *Am J Transplant*. 2006 Nov;6(11):2592-600.

Shimizu J, Koga M, Kishimoto M, Lee KJ, Iwasaki T, Miyake Y, et al. Effect of an autogenous free fat graft on hemilaminectomy defects in dogs. *J Vet Med Sci* 2009; 71(10):1291-4.

Shrager JB, Wain JC, Wright CD, Donahue DM, Vlahakes GJ, Moncure AC, et al. Omentum is highly effective in the management of complex cardiothoracic surgical problems. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125(3):526-32.

Stefani A, Jouni R, Alifano M, Bobbio A, Strano S, Regnard JF, Thoracoplasty in the Current Practice of Thoracic Surgery: A Single-Institution 10-Year Experience. *Ann. Thorac. Surg.*, January 2011; 91: 263 - 268

Stols AJ, Schützner J, Simonek J, Pafko P. Predictors of prolonged air leak following pulmonary lobectomy. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005 Feb;27(2):334-6.

Tansley P, Al-Mulhim F, Lim E, Ladas G, Goldstraw P. A prospective, randomized, controlled trial of the effectiveness of BioGlue in treating alveolar air leaks. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 132(1):105-12.

Tran TT, Kahn CR. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6(4):195-213.

Turk R, Weidringer JW, Hartel W, Blumel G. Closure of lung leaks by fibrin gluing. Experimental investigations and clinical experience. *Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 31(3):185-6.

Ugurlu BA, Sariosmanoglu ON, Metin SK, Hazan E. Pleural Flap for Treating Perigraft Leak After a Modified Blalock-Taussig Shunt *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1638-40.

Varela G, Jimenez MF, Novoa N, Aranda JL. Estimating hospital costs attributable to prolonged air leak in pulmonary lobectomy. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 27(2):329-33.

Warburton D, Perin L, Defilippo R, Bellusci S, Shi W, Driscoll B. Stem/progenitor cells in lung development, injury repair, and regeneration. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Aug 15;5(6):703-6.

Yoshimura M, Tsubota N, Matsuoka H, Sakamoto T. Efficacy of a pedicled pericardial fat pad fixed with fibrin glue on postoperative alveolar air leakage. *Surg Today* 2002; 32(1):26-8.

Zaretsky LS, Shindo ML, deTar M, Rice DH. Autologous fat injection for vocal fold paralysis: long-term histologic evaluation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104(1):1-4.

**ARTIGO CIENTÍFICO****Peritoneal free autologous fat graft for the control of pulmonary air leaks in emphysematous rat lungs**

José C Felicetti, Cristiano F Andrade, Eduardo Fontena, Raôni B Pereira, Gustavo Grun, Luiz Felipe Forgiarini, Paulo FG Cardoso, José S Moreira

**Abstract:**

Background: Persistent pulmonary air leak is the most frequent complication after lung resection resulting in an increase in postoperative morbidity and mortality. We evaluated the viability, integration and efficacy of free peritoneal fat graft as a method for controlling air leak in both normal and emphysematous rat lungs. Methods: Sixty Wistar rats were divided into two groups: elastase produced emphysema (n=30) and normal lungs (n=30). Pulmonary air leak was produced by direct puncture of the right lower lobe and aerostasis was attempted by means of intra pulmonary injection of autologous free peritoneal fat graft. Rats in each group (n=6) were randomly assigned into subgroups and were sacrificed at 7, 14, 21, 30 and 60 days. At sacrifice, lungs were removed for histology, morphometry, vessel identification and counting, imunohistochemistry for Caspase 3, VEGF and Factor VIII. Results: Tissue integration of the free fat grafts was found in all animals in both groups. Vessels stained with India ink inside the fat grafts were present at all periods in both groups. VEGF expression was significantly higher in all periods in the emphysema group compared to normal lungs ( $p<0.001$ ). There was a significant increase in caspase 3 expression in the emphysema group at 30 and 60 days ( $p<0.001$ ). Factor VIII showed a significant increase ( $p<0.001$ ) at 30 and 60 days in emphysematous lungs. Conclusion: The use of free peritoneal fat graft was able to control the air leaks in normal and emphysematous rat lungs with persisting graft viability for up to 60 days after implantation.

## **Introduction**

Persistent pulmonary air leak (PAL) can be defined as any air leak lasting longer than seven days (1, 3, 4) and it is the most frequent complication after lung resection. Its impact results in an increase in postoperative morbidity and mortality (1, 2). Its presence may also lead to empyema, pulmonary infection and eventually adult respiratory distress syndrome (ARDS). All these complications will result in prolonged hospitalization and will increase medical costs (5)

A variety of preoperative conditions are associated with the presence of post-operative PAL. Although the most prevalent is the presence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)(6), other conditions such as diabetes, upper lobectomies and incomplete fissures are also related to the presence of postoperative PAL. Recent advances in surgical techniques, instrumentation and in postoperative care have allowed patients with moderate to severe emphysema to be considered as surgical candidates for lung resection (6).

In order to minimize the risk of PAL after resection, the aerostasis must be meticulous and efforts must focus on careful intraoperative handling of the lung parenchyma during resection, particularly in COPD patients (7). In this regard, several techniques such as the use of mechanical sutures, biological glue, bovine pericardium, injection of autologous blood and aerostatic mechanical pulmonary suture have been used (4, 8, 9). The association of pericardial fat pad with biological adhesives has also been described as an effective method for decreasing the duration of PAL post-operatively (10).

We have used free fat grafts successfully in selected instances where intraoperative air leak was difficult to control with the usual measures, and the extent of the fat pad was not long enough to allow building a pedicled graft. Surprisingly it worked and, upon reoperating some of these patients for other causes, we have found an excellent integration of the free fat graft into the pulmonary parenchyma and the leaks have sealed completely (figure 1).

Based on this serendipitous clinical observation, we went back to the laboratory and designed an animal model of standardized pulmonary injury with air leak to put to test the efficacy, tissue integration and viability of the free peritoneal fat graft for aerostasis in both normal and emphysematous rat lungs.

## Material and Methods

### Experimental model

A pilot study included seven Wistar rats weighting 250-300g anesthetized with intraperitoneal ketamine (50mg/Kg) and Xylene (5mg/Kg), submitted to orotracheal intubation (#14 gauge Abbocath™, Abbott Laboratories, Columbia, Maryland, USA). The animals were ventilated with room air with a volume-cycled ventilator (tidal volume 10mL/Kg, respiratory rate 85 breaths/minute, PEEP 2cmH<sub>2</sub>O; Harvard Rodent Ventilator model 683, South Natick, MA). Animals were then submitted to a small laparotomy for the extraction of a fragment of the omentum (Figure 2A). The incision was closed with monofilament nonabsorbable suture. The animals were then placed in left lateral decubitus and a right posterolateral thoracotomy was performed on the fifth intercostal space. The pulmonary ligament was released bluntly resulting in a wide exposure of the base of the right lower lobe in which a 5mm deep perforating wound was produced with a #14GA needle. The presence of the air leak was confirmed by increasing the PEEP to 5 cmH<sub>2</sub>O (Figure 2B). The free fat graft was suctioned into the #14GA catheter attached to a 1ml syringe) and injected into the pulmonary perforation previously created until a complete obliteration of the pulmonary wound was obtained (Figure 2C). The volume used of the free autologous fat graft was approximately 0.1ml in each animal. Once the aerostatic effect of the free fat patch in the perforated area was verified by expanding the lung with a 5cmH<sub>2</sub>O PEEP, the chest was closed. Postoperative analgesia was performed using buprenorfine (0.05 mg/kg intramuscularly) and 0.5mL 1% lidocaine was administered subcutaneously around the incision site. All animals were given cefazolin preoperatively (15mg/kg intramuscularly). The animals were sacrificed at different time points as described below. All animals received care according to the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (National Institutes of Health Publication 85-23, revised, 1996).

### Study Groups

Animals were divided into two groups (emphysema and normal; n = 30 each). Animals in the emphysema group received an intra-tracheal dose of 10U of porcine pancreatic elastase (Sigma-Aldrich) diluted in 1ml of saline, whereas the control animals received the same volume of saline solution.

Animals from both groups were observed for 30 consecutive days. After the procedure, animals in both groups were randomly divided into five subgroups (n= 6 each) according to the time of sacrifice (7, 14, 21, 30 and 60 days, respectively). At the end of the observation period, animals were anesthetized, intubated and mechanically ventilated in the same fashion as described previously. A median sternotomy was performed and the right lung containing the free fat grafts were examined macroscopically. The pulmonary artery (PA) was cannulated through the right ventricle, the aorta was clamped and the left atrium opened. At this time the lungs were perfused with 20ml of saline at a 25 cmH<sub>2</sub>O pressure obtained by elevation of the perfusion solution. In order to verify the permeability of blood vessels in the graft, three animals in each subgroup received an additional 4ml of India ink through the PA at the same infusion pressure. The heart-lung block was extracted, fixed in 10% formalin for 24 hours, embedded in paraffin and sliced (5µm) in a microtome (Leitz® 1512, Ernst Leitz, Vienna, Austria). Slides were prepared with with hematoxylin and eosin staining (H&E) for histology and morphometry analysis.

#### Morphometry

In order to quantify pulmonary emphysema we randomly selected two animals of each subgroup (n=12) from both groups. The morphometric analysis was performed using twenty-five random pictures taken in 100x high power field. These pictures were adjusted to an axis of cartesian coordinates (x,y) to count the septum pierced by cartesian axes. This method helps establishing the average values in which interalveolar septa intersects a series of grid lines.

#### Vessels counting

For confirming de presence of vessels in the free fat grafts, sections were performed from the slides stained with H&E. Two blinded observers analyzed 10 fields randomly in the 6 animals of each subgroup (400X). The total number of counted vessels was represented as an average of each subgroup. Clusters of capillaries were counted as only one vessel.

#### Immunohistochemistry

Each lung section was deparaffinized with xylene and rehydrated with graded alcohols. The sections were retrieved in a microwave oven (300 Watts) in citrate buffer (pH 6.0) for 10 minutes at 100°C and then incubated in absolute methanol containing 3% hydrogen peroxide for 10 minutes at room temperature. The sections were sequentially pre-incubated with 10%



normal rabbit serum for 10 min at room temperature and were then incubated with antibody for VEGF, Factor VIII (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup> Santa Cruz, CA) and Caspase 3 (Cell Signaling Technology<sup>®</sup>, Beverly, MA). After 120 min at room temperature, they were treated with EnVision reagent for 30 min. After incubation, they were washed three times with PBS, and 3,39-diaminobenzidine was employed as a chromogen. The nuclei were lightly counterstained with hematoxylin solution. The primary antibodies were replaced with PBS containing 0.1% bovine serum albumin as a negative control.

#### Immunohistochemical Scoring

Semi-quantitative analysis was carried out using a Nikon Labophot optical microscope (Tokyo, Japan). Percentage of expression in stained pixels was determined by histomorphometric analysis using a digital camera connected to an image capture board of a computer running the Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0 software (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA). From each slide, 10 images were captured from randomly selected high power fields. Every image exhibited on the monitor was adjusted to the same threshold level, and the area of the structures was measured in pixels. The total amount of pixels per image remained constant in all fields. The percentage of expression in stained pixels in each image was then calculated using the ratio of the stained pixels area to the total amount of pixels per image. The stained pixels were selected using the software and were calibrated with a positive control. A blinded pathologist to study groups performed the histological examination.

#### Statistical analysis

The data was stored in a personal computer using Excel<sup>®</sup> worksheet. The statistical analysis was performed using StatGraphics Plus 2.1 (Statistical Graphics Corporation-USA), using Student T test and analysis of variance (ANOVA). The results are represented as mean and standard deviation of the mean, and significance defined as  $p < 0.05$ .

### **Results**

Overall mortality was 3 animals per group, and all occurred during the surgical procedure. After surgery all animals survived their observation periods. Tissue integration of the free autologous fat grafts was observed in all animals in both groups at all times of sacrifice. There was a significant reduction in the number of septa in the emphysema group ( $p < 0.001$ ). All animals from the different groups at all different time periods showed vessels stained with

India ink inside the fat graft (Figure 3). There were no significant differences in the number of vessels in the fat graft in both groups when comparing 7 days [ $9.25 \pm 4.5$  vessels (normal) -  $6.17 \pm 2.52$  (emphysema)] and 60 days [ $8.42 \pm 2.84$  vessels (normal) -  $5.83 \pm 2.69$  (emphysema)] after implantation.

The evaluation of VEGF by immunohistochemistry, confirmed its presence in the free fat grafts at all time periods. VEGF expression was significantly higher in all periods in the emphysema group in comparison to normal lungs, as shown in Figure 4A. At 30 and 60 days in the emphysema group there was a significant decrease in VEGF expression if compared to the earlier time periods ( $p < 0.001$ ) (Figure 4A). There was a significant increase in caspase 3 expression in the emphysema group at 30 and 60 days, as shown in Figure 4B ( $p < 0.001$ ). Caspase 3 expression in the emphysema group at 21 days was significantly higher than at days 7, 14, 21 and 30 in the normal group ( $p < 0.05$ ) (Figure 4B). The immunohistochemical analysis for factor VIII for the evaluation of neovascularization showed a significant increase ( $p < 0.001$ ) in vascular density both at 30 and 60 days following free fat graft implantation in emphysematous lungs in comparison to the other subgroups and at all observation periods from normal lungs (Figure 4C).

## **Discussion**

This study showed the integration and viability of free fat grafts into the lung parenchyma as far as 60 days after its implantation. The clinical use of autologous free fat graft has been reported in neurosurgery for the treatment of liquor fistulae (11) and in head and neck surgery for the treatment of vocal cord paralysis (12). There are several studies using this strategy in reconstructive plastic surgery with transplantation of fat cells to fill cosmetic deformities. The studies have unanimously shown that there is a gradual decrease in size of the graft. The progressive reduction in the graft size is probably a consequence of necrosis and apoptosis of the fat cells (13). Nishimura et al tried to explain this phenomenon using free fat graft on the back of adult rats. Within the first four days the graft viability was maintained by osmosis, whereas angiogenesis started following the release of vascular endothelial growth factor, which was triggered by hypoxia (13). Such cascade of events ultimately lead to graft revascularization. The same authors demonstrated a reduction in VEGF stimulus after 30 days, inducing a graft size reduction mediated by apoptotic mechanisms (13).

In our study, there was vascularization of the graft as early as 7 days after injection, which represents fat tissue preservation and viability. There was a progressive increase in apoptotic activity in the emphysema group starting at 21 days as shown by the caspase 3 results. This model of emphysema has a progressive destruction of alveoli (14), which therefore can potentially compromise the graft cells, leading to fat cell death or fat graft size reduction. Additionally, hypoxia and the poor nutritional status of the grafted fat cells in the emphysematous lungs could be responsible for an increased expression of apoptotic cells at longer periods, since such conditions might cause genetic signals to trigger apoptosis (13).

The percentage of VEGF expression of fat grafts in the emphysema group was constantly higher when compared to normal lungs at all time periods, however there was a significant and progressive decrease starting at 30 days and thereon. Interestingly, this finding contrasts with the gradual increase of factor VIII expression at this point. Such observations probably reflect a switch of the angiogenic stimulus to an increase in vascular density characterized by significant higher factor VIII expression. The constantly higher VEGF expression in the fat grafts in the emphysema group may represent a result of this particular environment, since such lungs have an increased oxygen demand favoring the synthesis of growth factors and consequently more stimuli for neovascularization (15).

Yoshimura et al used pedicled pericardial fat graft as a cheap and efficient way to control air leak in pulmonary resections (10). Matsumoto et al showed that the use of free fat graft from the pericardium was also effective in preventing air leak in pulmonary resections in humans (16). They have also employed this technique in dogs, filling a 2 centimeter defect in the lung parenchyma. It allowed chest tube removal immediately after closing of the chest wall in all animals with no further complications or air leaks. At 30 days after implantation, the fat grafts remained attached on the lung surface (16).

In our study, even in observation periods as long as 60 days, the fat grafts remained viable in the pulmonary parenchyma and were easily indentified. It has been shown that adipose tissue contains a population of adult mesenchymal stem cells with regenerative properties (17). Such properties of fat cells would be an alternative to delivery of adipose tissue-derived stromal cells to damaged lung tissues (18). It has been shown that these cells have the ability to stimulate lung regeneration through the synthesis of growth factors specially the Hepatocyte Growth Factor (HGF). It occurs when cells are either infused intravenously or organized into

polyglycolic acid felt sheets and further attached to rat emphysematous lungs undergoing lung volume reduction surgery (17, 18). Moreover, the encouraging histological and molecular results demonstrated an improvement in blood gas exchange and exercise capacity, suggesting that these cells may have also play some role in the treatment of emphysema (17, 18). Although, we have not studied the potential regenerative applications of the free fat graft in pulmonary parenchyma, we hypothesize whether its use could have had a potential regenerative benefit in the emphysematous lungs.

Our study has limitations beginning with the standardized lesion of the lung parenchyma that is far fetched from the real clinical situation. Nevertheless, the demonstration of viability of the free fat grafts and its possible mechanisms and benefits have paved the way to testing this in a larger animal model in order to validate it.

This study demonstrated in a small animal model of elastase induced pulmonary emphysema that the use of a free peritoneal fat graft is effective in controlling pulmonary air leaks. It also provides important information about the efficacy of the use of free autologous fat graft into normal and emphysematous rat lungs for future studies.

## References

1. Brunelli A, Cassivi SD, Halgren L. Risk factors for prolonged air leak after pulmonary resection. *Thorac Surg Clin.* 2010 Aug;20(3):359-64.
2. Murthy SC. Air leak and pleural space management. *Thorac Surg Clin.* 2006 Aug;16(3):261-5.
3. Brunelli A, Monteverde M, Borri A, Salati M, Marasco RD, Fianchini A. Predictors of prolonged air leak after pulmonary lobectomy. *Ann Thorac Surg.* 2004 Apr;77(4):1205-10; discussion 10.
4. Merritt RE, Singhal S, Shrager JB. Evidence-based suggestions for management of air leaks. *Thorac Surg Clin.* 2010 Aug;20(3):435-48.
5. DeCamp MM, Blackstone EH, Naunheim KS, Krasna MJ, Wood DE, Meli YM, et al. Patient and surgical factors influencing air leak after lung volume reduction surgery: lessons

learned from the National Emphysema Treatment Trial. *Ann Thorac Surg.* 2006 Jul;82(1):197-206; discussion -7.

6. Sanchez PG, Vendrame GS, Madke GR, Pilla ES, Camargo Jde J, Andrade CF, et al. Lobectomy for treating bronchial carcinoma: analysis of comorbidities and their impact on postoperative morbidity and mortality. *J Bras Pneumol.* 2006 Nov-Dec;32(6):495-504.

7. Droghetti A, Schiavini A, Muriana P, Folloni A, Picarone M, Bonadiman C, et al. A prospective randomized trial comparing completion technique of fissures for lobectomy: stapler versus precision dissection and sealant. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Aug;136(2):383-91.

8. Balsara KR, Balderson SS, D'Amico TA. Surgical techniques to avoid parenchymal injury during lung resection (fissureless lobectomy). *Thorac Surg Clin.* 2010 Aug;20(3):365-9.

9. Rice TW, Blackstone EH. Use of sealants and buttressing material in pulmonary surgery: an evidence-based approach. *Thorac Surg Clin.* 2010 Aug;20(3):377-89.

10. Yoshimura M, Tsubota N, Matsuoka H, Sakamoto T. Efficacy of a pedicled pericardial fat pad fixed with fibrin glue on postoperative alveolar air leakage. *Surg Today.* 2002;32(1):26-8.

11. Landeiro JA, Lazaro B, Melo MH. Endonasal endoscopic repair of cerebrospinal fluid rhinorrhea. *Minim Invasive Neurosurg.* 2004 Jun;47(3):173-7.

12. Zaretsky LS, Shindo ML, deTar M, Rice DH. Autologous fat injection for vocal fold paralysis: long-term histologic evaluation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995 Jan;104(1):1-4.

13. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *Laryngoscope.* 2000 Aug;110(8):1333-8.

14. Schmiedl A, Lempa T, Hoymann HG, Rittinghausen S, Popa D, Tschernig T, et al. Elastase-induced lung emphysema in rats is not reduced by hematopoietic growth factors

when applied preventively. *Virchows Arch.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Jun;452(6):675-88.

15. Walters EH, Reid D, Soltani A, Ward C. Angiogenesis: a potentially critical part of remodelling in chronic airway diseases? *Pharmacol Ther.* [Review]. 2008 Apr;118(1):128-37.

16. Matsumoto I, Ohta Y, Oda M, Tsunezuka Y, Tamura M, Kawakami K, et al. Free pericardial fat pads can act as sealant for preventing alveolar air leaks. *Ann Thorac Surg.* 2005 Dec;80(6):2321-4.

17. Shigemura N, Okumura M, Mizuno S, Imanishi Y, Nakamura T, Sawa Y. Autologous transplantation of adipose tissue-derived stromal cells ameliorates pulmonary emphysema. *Am J Transplant.* 2006 Nov;6(11):2592-600.

18. Shigemura N, Okumura M, Mizuno S, Imanishi Y, Matsuyama A, Shiono H, et al. Lung tissue engineering technique with adipose stromal cells improves surgical outcome for pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Dec 1;174(11):1199-205.

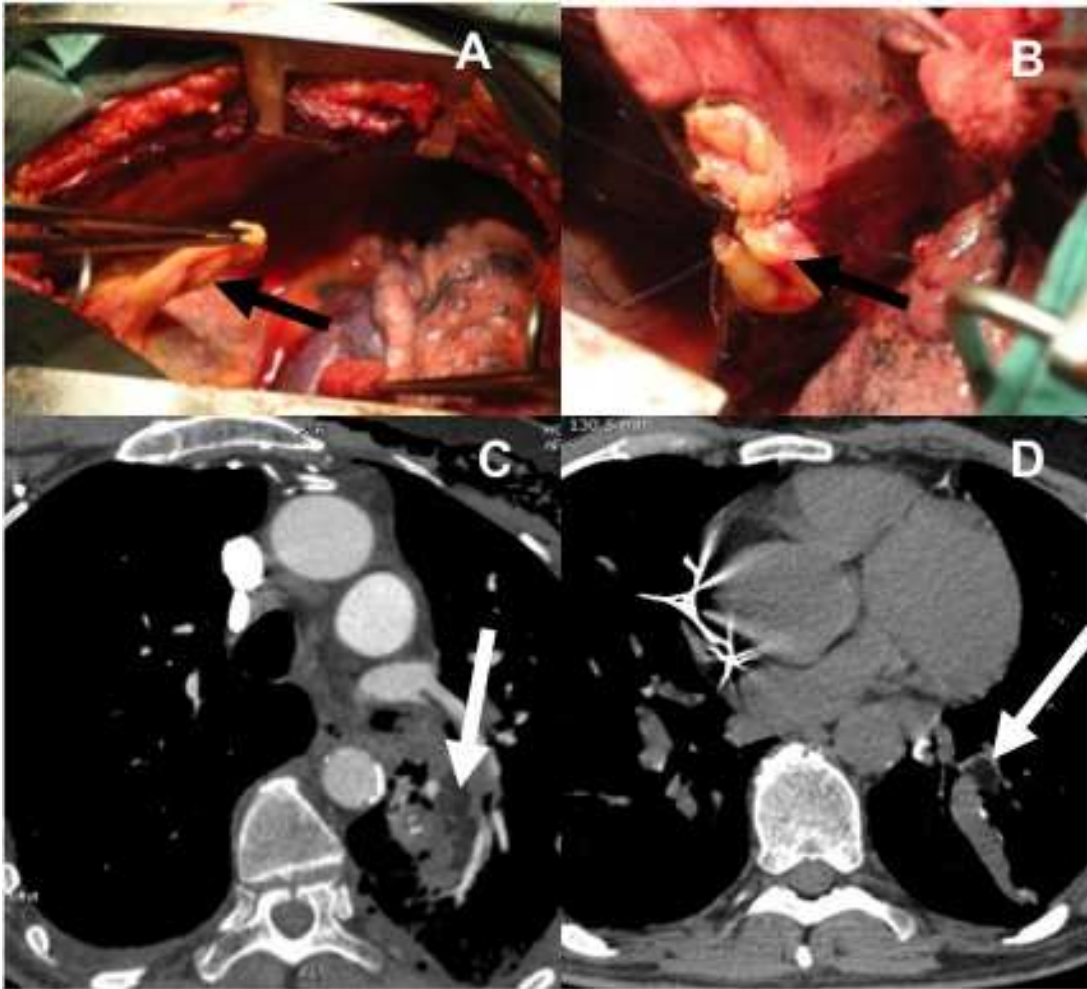


Figure 1: A 61 year-old man submitted to lower lobe lobectomy due to bronchial carcinoma. (A) isolation of pericardial fat (black arrow); (B) free pericardial fat sutured on lung bloody surface (black arrow); (C) Chest CT showing pericardial fat in the lung parenchyma (white arrow) 36 hours and (D) 3 months after surgery.

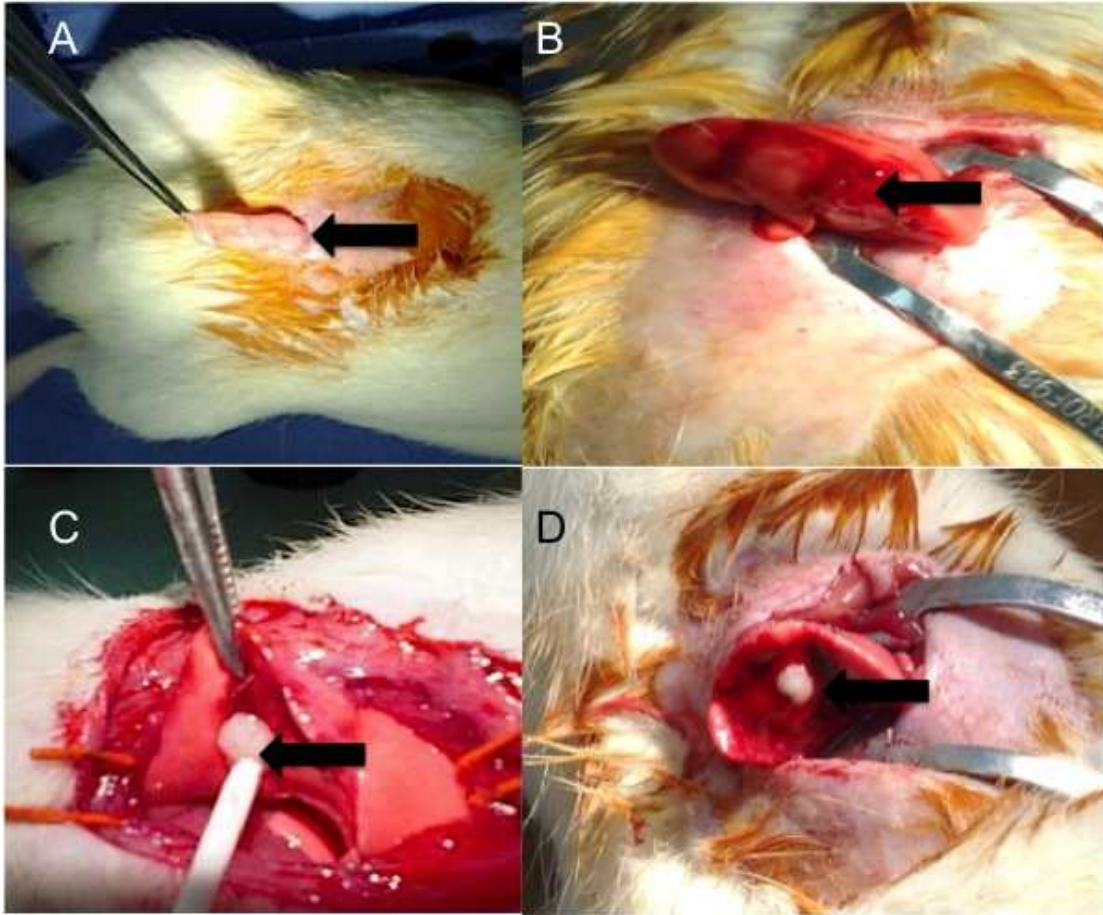


Figure 2: (A) peritoneal fat (arrow) harvested through a small abdominal incision; (B) lung after penetrating injury and air leak test (arrow) using 5 cmH<sub>2</sub>O PEEP; (C) injection of the free fat graft (arrow); (D) fat graft at the base of the lung with no air leak.



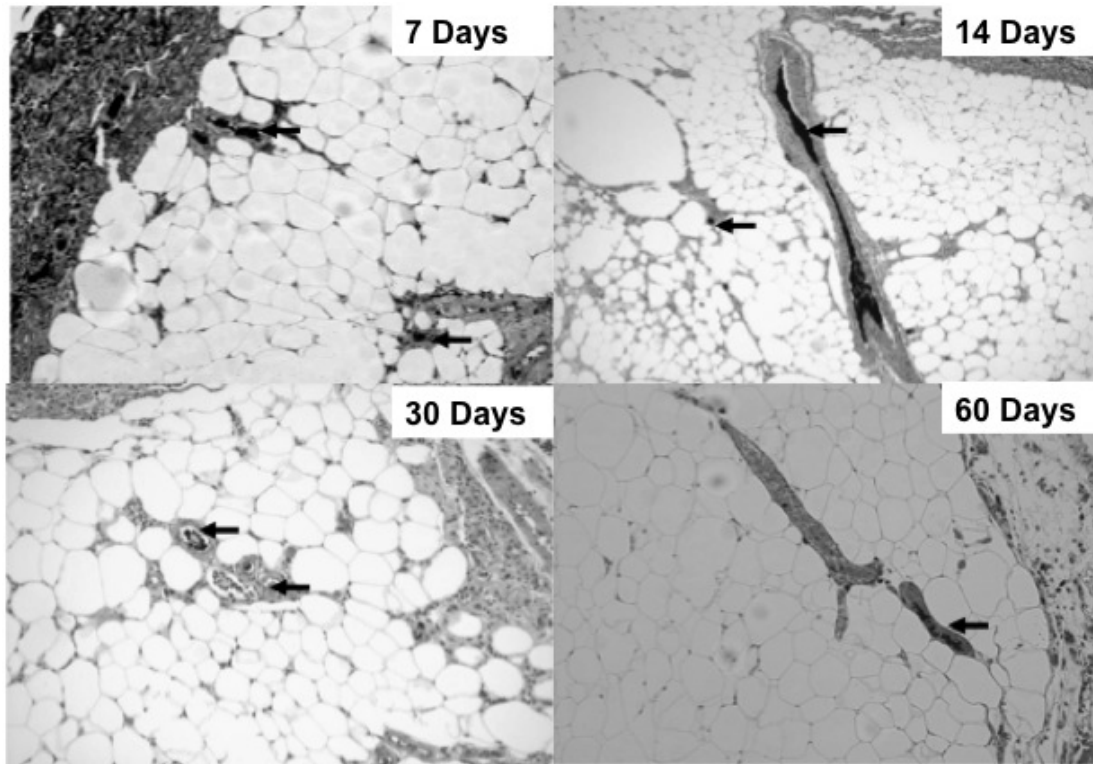


Figure 3: rat lungs with emphysema after different time periods showing graft vessels stained with India ink (arrows) (100x).

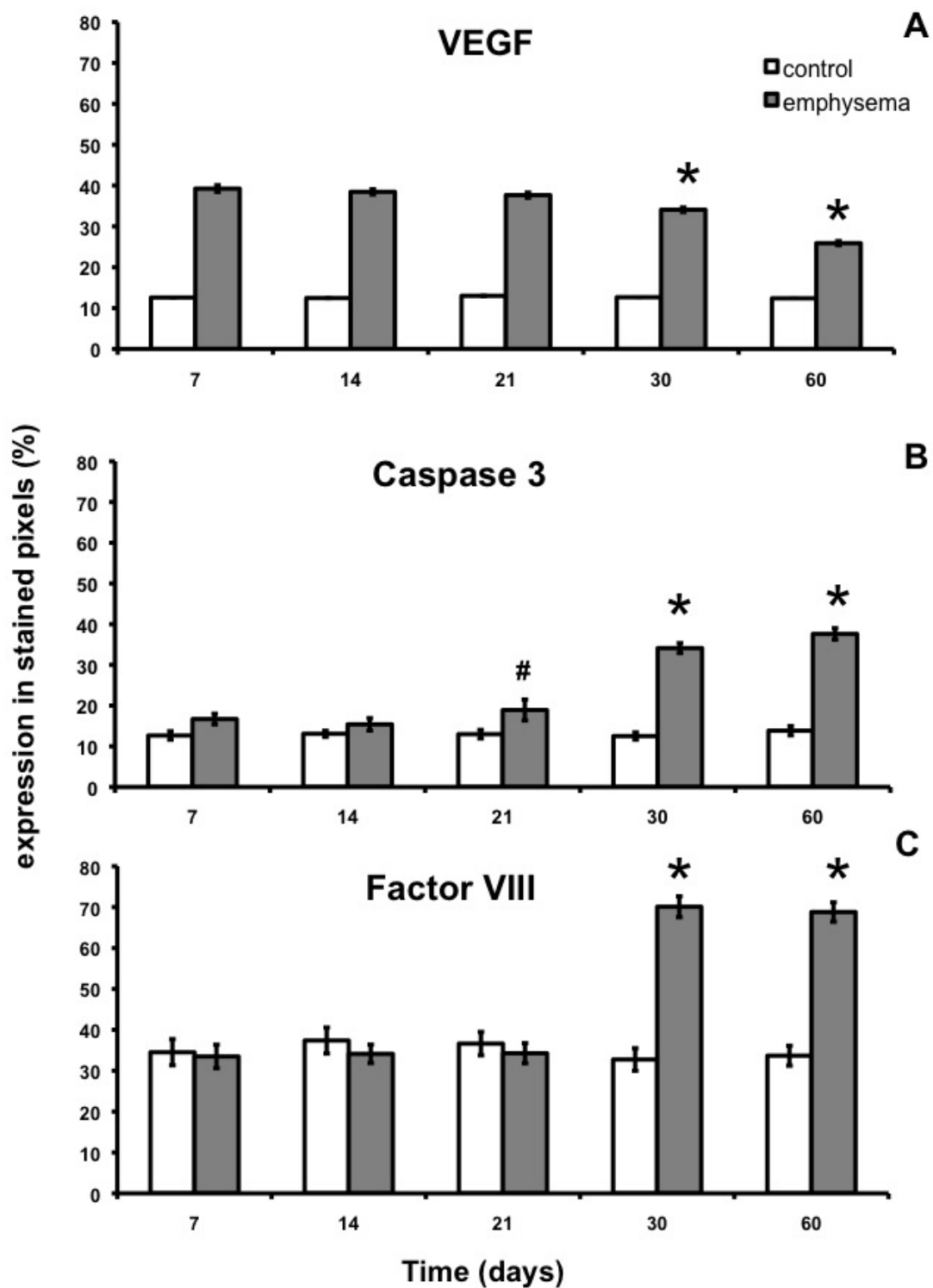


Figure 4: Analysis of the percentage of pixels stained by immunohistochemistry for VEGF, caspase-3 and Factor VIII. A- VEGF expression decreased significantly after 30 and 60 days in the emphysema group (\* $p < 0.001$ ), however it is still higher than the group with normal lungs. B - Caspase 3 expression increased significantly after 30 and 60 days in comparison to normal lung group at all different periods (\* $p < 0.001$ ). At day 21 in emphysematous lungs there was an increased caspase-3 expression when

compared to days 7, 14, 21 and 30 of normal lungs ( $p < 0.05$ ). C- Factor VIII expression significantly increased at days 30 and 60 in the emphysematous lungs when compared to all time periods of normal lungs