

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

VIABILIDADE DA APLICAÇÃO ENDOBRÔNQUICA DE
PERFLUOROCARBONO LÍQUIDO COMO MÉTODO DE PROTEÇÃO
PULMONAR EM DIFERENTES FASES DO TRANSPLANTE PULMONAR EM
RATOS

LUIZ ALBERTO FORGIARINI JUNIOR

Porto Alegre

2011

LUIZ ALBERTO FORGIARINI JUNIOR

**VIABILIDADE DA APLICAÇÃO ENDOBRÔNQUICA DE
PERFLUOROCARBONO LÍQUIDO COMO MÉTODO DE PROTEÇÃO
PULMONAR EM DIFERENTES FASES DO TRANSPLANTE PULMONAR EM
RATOS**

*Tese de Doutorado do Programa de Pós-
graduação em Ciências Pneumológicas, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

*Orientador: Prof. Dr. Cristiano Feijó
Andrade*

Porto Alegre

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Forgiarini Junior, Luiz Alberto

Viabilidade da aplicação endobrônquica de perfluorocarbono líquido como método de proteção pulmonar em diferentes fases do transplante pulmonar em ratos / Luiz Alberto Forgiarini Junior. -- 2011. 151 f.

Orientador: Cristiano Feijó Andrade.

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

1. Transplante Pulmonar. 2. Preservação Pulmonar. 3. Isquemia-reperfusão. 4. Modelo Experimental. I. Andrade, Cristiano Feijó, orient. II. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Marisete Forgiarini e Luiz Alberto Forgiarini. A minha mãe pela dedicação incondicional a mim desde de meus primeiros passo até este momento, seja na preocupação de cada passo meu ou até nas madrugadas acordada ao meu lado somente para me fazer companhia. Dedicou-se a mim como uma leoa, me dando amor, atenção, carinho e sempre me defendendo de algo que pudesse me ferir. Ao meu pai, que me ensinou como ser um homem com honra e modestia, destacando os princípios que norteiam um homem de caráter. Concluo esta jornada pois tive muito apoio e uma base sólida criada por vocês que não mediram esforços para minha educação.

Ao Lipe, meu irmão, pela amizade companheirismo em todos os momentos dessa jornada, tornando ela mais divertida e tranquila nas noites no laboratório; uma pessoa que a cada dia me ensina uma maneira diferente de ver a vida.

Agradecimentos

Ao Dr. Cristiano Feijó Andrade, meu orientador, uma pessoa exemplar como profissional e pesquisador, pela sua dedicação ao trabalho assim como pelo estímulo e apoio as minhas idéias e confiança depositada no presente trabalho.

Ao Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso, pelo oportunidade que a mim foi concedida e possibilitou a execução deste projeto. Por sua dedicação a pesquisa a qual utilizo como exemplo a ser seguido.

A Profa. Dra Norma Possa Marroni, pela minha lapidação quando iniciei a trabalhar com pesquisa, sempre nos ensinando e cobrando de uma forma maternal na nossa aprimoração.

Ao Dr. Alexandre Simões Dias, amigo e parceiro de trabalho até hoje, uma pessoa com característica ímpar como homem e profissional. Por ter acreditado no meu potencial a anos atrás que resulta em uma parceria sólida.

Ao meu grande amigo Darlan, parceiro incansável em todos os momentos, sempre disposto a ajudar as pessoas pelo simples fato de auxiliar. O seu aprimoramento humorístico tornou nossas horas de trabalho mais leves e divertidas.

Ao grande amigo e parceiro de pesquisa Néelson, por todas as contribuições que enriqueceram este trabalho, pela disponibilidade e principalmente por sua amizade.

Ao Gustavo Ochs, pela disponibilidade no auxílio das análises e discussões durante a implementação de técnicas.

Ao ex-aluno e hoje médico Gustavo Grün pela dedicação na fase experimental do projeto assim como as discussões que serviram para melhorarmos a implementação do modelo experimental.

Aos alunos Arthur Holand, Rodrigo Mariano, Artur de Oliveira Paludo e Antonino Almeida pela parceria e disponibilidade para realização das fases experimentais do projeto.

Lista de Figuras

FIGURA 1 Formação de espécies reativas do oxigênio durante a isquemia-reperfusão e a anóxia-reoxigenação no pulmão.31

ARTIGO 1: When is the injury potentially reversible in a lung ischemia-reperfusion model?

FIGURE 1 Effects of different times of ischemia on pulmonary lipid peroxidation, evaluated using the TBARS assay 72

FIGURE 2 Caspase 3 activity in different times of ischemia ... 73

FIGURE 3 Apoptosis and Necrosis Quantification 74

FIGURE 4 Caspase 3 Imunofluorescence 75

FIGURE 5 Photomicrograph of the lung in different times of ischemia 76

ARTIGO 2: Endobronchial perfluorocarbon decreases lung injury in an experimental model of ischemia and reperfusion

FIGURE 1	Effects of ischemia on pulmonary lipid peroxidation, evaluated using the TBARS assay	92
FIGURE 2	Effects of ischemia on mean arterial pressure	93
FIGURE 3	Effects of ischemia on pulmonary activity of Superoxide Dismutase	94
FIGURE 4	Expression of NF- κ B in lung tissue	95
FIGURE 5	PFC attenuated of caspase 3 expression in lung tissue	96
FIGURE 6	The effect of PFC and IR on iNOS	97
FIGURE 7	PFC reduce lung injury as assessed by histology ..	98
ARTIGO 3: Endobronchial perfluorcarbon confers lung protection prior and after transplantation in an animal experimental model		
FIGURE 1	Morphometrics lungs in three different doses of liquid perfluorocarbon	120

FIGURE 2	Effects of different periods of lung preservation on pulmonary lipid peroxidation	121
FIGURE 3	Caspase 3 activity in different times of lung preservation	122
FIGURE 4	TUNEL staining	123
FIGURE 5	NF- κ B expression in different times of lung preservation	124
FIGURE 6	Evaluation of oxidative stress and antioxidant enzymes	125
FIGURE 7	Expression of NF- κ B in lung tissue	126
FIGURE 8	PFC attenuated of caspase 3 expression in lung tissue	127
FIGURE 9	The effect of lung transplantation on iNOS	128
FIGURE 10	Expression of Nitrotyrosine in lung tissue	129
FIGURE 11	Immunofluorescence of caspase 3 and I κ B	130

FIGURE 12 PFC reduce lung injury as assessed by histology 131

Abreviaturas

(A-a)DO₂ – Gradiente alvéolo-arterial de oxigênio

ABTO – Associação Brasileira de Transplante de órgãos

ADP - Difosfato de Adenosina

AMP - Monofosfato de Adenosina

ATP - Trifosfato de Adenosina

CAT – Catalase

CO₂ - Gás Carbônico

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

EVLP – Perfusão Pulmonar Ex-vivo

GPx – Glutathione Peroxidase

GSH - Glutathione

GSH-redutase – Glutathione Redutase

H₂O – Água

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

I κB – Inibidor kappa B

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível

IR – Isquemia-reperfusão

K⁺ - Potássio

LPD – Low Potassium Dextra

MgSO₄ – Sulfato de Magnésio

MPO – Mieloperoxidase

Na⁺ - Sódio

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NF- κ B - Fator de Transcrição Nuclear kappa beta

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

O₂ - Oxigênio

O₂⁻ - Radical Superóxido

O₂⁻ - Superóxido

OH⁻ - Radical Hidroxila

PaCO₂ – Pressão Parcial de Gás Carbônico no sangue arterial

PAM – Pressão Arterial Média

PaO₂ – Pressão Parcial de Oxigênio no sangue arterial

PEEP – Pressão Expiratória Final Positiva

PFC – Perfluorocarbono

SOD – Superóxido Dismutase

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

UW - University of Wisconsin

Sumário

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	XI
SUMÁRIO	XIII
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 HISTÓRICO DOS TRANSPLANTES PULMONARES	11
2.2 ESTADO ATUAL DA DOAÇÃO DE ÓRGÃOS NO BRASIL E MANUTENÇÃO DOS RECEPTORES	13
2.3 HISTÓRICO DA PRESERVAÇÃO PULMONAR.....	14
2.4 PERFUSÃO PULMONAR EX-VIVO	17
2.5 LÍQUIDOS DE PRESERVAÇÃO PULMONAR.....	21
2.6 SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO ESTUDADAS EM TRANSPLANTE PULMONAR	23
2.6.1 <i>Euro-Collins</i>	23
2.6.2 <i>Belzer-UW</i>	24
2.6.3 <i>Low Potassium Dextran - LPD</i>	25
2.6.4 <i>Celsior</i>	26
2.7 DISFUNÇÃO PRIMÁRIA DO ENXERTO	28
2.8 LESÃO DE REPERFUSÃO PULMONAR.....	29
2.9 ESTRESSE OXIDATIVO E LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO	30
2.10 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE	32
2.11 ENDOTÉLIO	33
2.12 APOPTOSE E LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO PULMONAR.....	34
2.13 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.....	35
2.13.1 <i>Fator de Transcrição Nuclear kappa B</i>	35
2.13.2 <i>Óxido Nítrico</i>	36
2.14 PERFLUOROCARBONOS.....	37
3. JUSTIFICATIVA	40
4. OBJETIVOS	42
4.1 OBJETIVO GERAL	42
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
6. ARTIGO I	55
7. ARTIGO II	77
8. ARTIGO III	99
9. CONCLUSÃO	136
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	137

Resumo

O transplante pulmonar é uma terapia estabelecida para pacientes com doença pulmonar em estágio final. No entanto, sua principal limitação é o escasso número de doadores associado ao curto tempo de isquemia pulmonar. Numerosos estudos têm sido realizados para otimizar a técnica de preservação pulmonar e melhorar os resultados pós-transplante. Não obstante, no período pós-operatório imediato, os receptores podem apresentar complicações graves como a lesão de isquemia-reperfusão (IR), rejeição aguda e infecção. Isquemia-reperfusão induz a lesão pulmonar aguda sendo a principal causa de morbidade e mortalidade precoce após o transplante pulmonar, podendo levar rapidamente a falência do enxerto primário.

Perfluorcarbono líquido (PFC) são substâncias com propriedades únicas físicas e químicas, tais como o recrutamento de alvéolos colapsados, melhora das trocas gasosas, a proteção da arquitetura pulmonar, atividades anti-inflamatória e anti-oxidante. Estas características fazem dos PFCs potenciais substâncias que podem proteger os pulmões em diferentes contextos do transplante pulmonar.

Usamos perfluorcarbono líquido (PFC) em um modelo experimental de isquemia e reperfusão pulmonar e transplante pulmonar em ratos. Primeiro, estudamos um modelo animal muito bem conhecido de lesão IR utilizando diferentes tempos de isquemia enfocando a apoptose, a fim de verificar qual o ponto de tempo iria apresentar os danos mais graves e potencialmente reversíveis de isquemia. Depois de confirmados 45 minutos como o período de lesões mais proeminentes com a potencial reversibilidade celular, estudamos os efeitos do PFC usando este modelo. O estudo envolveu três grupos: sham, isquemia e reperfusão e isquemia e reperfusão tratados com PFC. Houve um aumento significativo na atividade antioxidante da enzima superóxido dismutase (SOD) e uma redução significativa na expressão do Fator Nuclear κ B (NF- κ B), caspase 3 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no grupo tratado com PFC ($p < 0,05$).

Finalmente, usando um modelo de preservação pulmonar para transplante, testamos diferentes doses de PFC (3 e 7 ml/kg) durante períodos

específicos de isquemia pulmonar fria em comparação a um grupo controle de preservação pulmonar convencional (baixa concentração de potássio e dextran - Perfadex ®) .

Os pulmões foram preservados por 3, 6, 12 e 24 horas. Usando uma dose de 7ml/kg de PFC, houve uma redução significativa na atividade 3 capase e expressão NFκB em 12 horas de preservação a frio. Por outro lado, o grupo controle apresentou a maior expressão de capase 3, neste ponto do tempo. Depois, analisou-se os efeitos da PFC em morte celular, resposta inflamatória e estresse oxidativo em enxertos de pulmão transplantado. Utilizamos 12 horas de preservação pulmonar com uma dose de 7 ml/kg de PFC em comparação a um grupo controle de preservação pulmonar no mesmo tempo. Observou-se que o uso de PFC endobrônquico reduziu significativamente a expressão do NF-κB, caspase 3, iNOS e nitrotirosina, bem como a lesão pulmonar histológica.

Em conclusão, o uso de PFC endobrônquico como adjuvante à estratégia de preservação atual melhorou tanto a preservação do enxerto e da função pulmonar precoce após o transplante pulmonar, reduzindo os efeitos deletérios da isquemia-reperfusão.

Abstract

Lung transplantation is an established therapy for patients with end-stage lung disease. However, its major limitation is the scarce number of donors associated to the short lung ischemic time. Numerous studies have been performed to optimize the technique of lung preservation and improve the results post transplantation. Nevertheless, in the early postoperative period, recipients may present with severe complications such as ischemia-reperfusion (IR) injury, acute rejection and infection. Ischemia-reperfusion induced acute lung injury is the major cause of early morbidity and mortality after lung transplantation and may rapidly lead to primary graft failure.

Liquid perfluorocarbons (PFCs) are substances with unique physical and chemical properties such as recruitment of collapsed alveoli, improvement of gas exchange, protection of pulmonary architecture, anti-inflammatory and anti-oxidant activities. These characteristics make PFCs potential substances that may protect the lungs in different settings of lung transplantation.

We used liquid perfluorocarbon (PFC) in an experimental model of pulmonary ischemia-reperfusion and lung transplantation in rats. First, we studied a very well-known animal model of IR injury using different ischemic times focusing on apoptosis in order to verify which time point would present the most severe and potentially reversible ischemic damage. After established forty-five minutes as the period of more prominent injury with potential cell reversibility, we studied the effects of PFC using this model. The study involved three groups: sham, ischemia-reperfusion and ischemia-reperfusion treated with

PFC. There was a significant increase in antioxidant enzyme superoxide dismutase activity (SOD) and a significant reduction in Nuclear Factor κ B (NF- κ B), caspase 3 and inducible nitrite oxide synthase (iNOS) expression in PFC treated group ($p < 0.05$).

Finally, using a model of lung preservation for transplant, we tested different doses of PFC (3 and 7 ml/kg) during specific times of lung cold ischemia in comparison to a control group of conventional lung preservation (low potassium dextran - Perfadex®). The lungs were preserved for 3, 6, 12 and 24 hours. Using a dose of 7ml/kg of PFC there was a significant reduction on caspase 3 activity and NF κ B expression at 12 hours of cold preservation. On the other hand, the control group presented the highest expression of caspase 3 at this time point. Afterwards, we analyzed the effects of PFC on cell death, inflammatory response and oxidative stress on transplanted lung grafts. We used 12-hours preserved lungs with a dose of 7 ml/kg of PFC in comparison to a control group of current lung preservation at the same time point. We observed that the use of endobronchial PFC significantly reduced the expression of NF- κ B, caspase 3, iNOS and nitrotyrosine as well as histological lung injury.

In conclusion the use of endobronchial PFC as an adjuvant to the current preservation strategy has improved both graft preservation and the early pulmonary function following lung transplantation, reducing the deleterious effects ischemia reperfusion injury.

1. Introdução

O transplante pulmonar pode apresentar várias complicações no período pós-operatório precoce, como lesão de isquemia/reperfusão, atelectasia, rejeição e infecção. Avanços nas técnicas de preservação pulmonar têm reduzido a incidência de disfunção precoce do enxerto, entretanto os mecanismos que envolvem a lesão de reperfusão ainda são responsáveis por cerca de 20% da mortalidade após o transplante pulmonar (1, 2). O insulto isquêmico ao pulmão durante o período de armazenamento e implante pode induzir a uma resposta inflamatória capaz de afetar não somente a função do enxerto na reperfusão, como também no resultado funcional a longo prazo.

Frente à reduzida oferta de doadores que permanece como o principal obstáculo ao desenvolvimento dos programas de transplante pulmonar, fontes alternativas de obtenção de órgãos e melhorias na preservação pulmonar têm sido estudadas (3). A preservação pulmonar para transplante através da administração de soluções na circulação pulmonar no ato da extração do enxerto, é o método de eleição em uso clínico corrente. O composto mais utilizado atualmente é uma solução contendo baixo teor de potássio e dextran-40, conhecida como LPD (*low potassium dextran* – Perfadex®), o que permite a manutenção do metabolismo celular durante o período de armazenamento do órgão. Este método associado a outros cuidados, como a insuflação pulmonar com oxigênio a temperaturas entre 0 e 4°C, e períodos de isquemia hipotérmica menores que 6 horas, têm relação direta com o desempenho do órgão transplantado (4).

Várias substâncias e métodos de preservação pulmonar têm sido estudados, dentre elas encontram-se os perfluorocarbonos (PFC) líquidos (5).

Os perfluorocarbonos são substâncias que possuem baixa tensão superficial, alta densidade, são insolúveis em água, além de permitirem alta difusão de oxigênio (O_2) e gás carbônico (CO_2). Estes compostos atuam recrutando alvéolos colapsados, melhorando a oxigenação, além de possuírem atividades anti-inflamatórias (6). Também atuam como carreadores de impurezas, limpando a superfície alveolar de resíduos da degradação celular (7).

Devido as suas propriedades de manutenção da estrutura alveolar, os PFC podem ter um importante fator para preservação pulmonar após o transplante, e juntamente, por suas atividades anti-inflamatórias poderiam ser responsáveis pela diminuição ou atenuação da lesão de reperfusão após o transplante pulmonar (8, 9).

A utilização de perfluorocarbono em modelos de transplante pulmonar é recente. Existem apenas poucos trabalhos realizados, que analisaram o desempenho funcional do enxerto por período de observação de 6 horas, apresentando resultados conflitantes, quanto a efetividade deste produto (10-14). Itano et al. (15), utilizaram PFC após o transplante pulmonar enquanto que Loehe et al. (5) instilaram PFC antes do transplante como método único de preservação pulmonar, ambos os estudos foram realizados com preservação pulmonar de 18 horas de isquemia fria.

Andrade et al demonstraram que enxertos extraídos após 3 horas de isquemia normotérmica pós-parada cardio-circulatória e que receberam perfluorocarbono após a reperfusão do pulmão transplantado, apresentavam-

se viáveis até 6 horas de reperfusão (16). Entretanto, a comparação destes pulmões com enxertos reperfundidos e ventilados convencionalmente (ventilação mecânica controlada a volume) não demonstraram melhora das trocas gasosas no grupo de animais que receberam PFC. Os autores concluíram que a severidade da lesão já instalada pelas 3 horas de isquemia normotérmica não teria seus efeitos amenizados pelo PFC após a reperfusão (17). Esta resposta pode ser dependente do estresse oxidativo, caracterizado pela formação das espécies reativas de oxigênio. Os dois mecanismos que usualmente geram sua produção são o acúmulo de hipoxantina e a conversão de xantina desidrogenase em xantina oxidase durante a anóxia, e posterior degradação da hipoxantina em superóxido no momento da reoxigenação. O outro mecanismo é dependente do sistema NADPH oxidase presente no endotélio e na membrana plasmática de neutrófilos e macrófagos, responsável por catalisar a redução do oxigênio em peróxido de hidrogênio e superóxido¹⁸.

Fischer et al (18), utilizando pulmões de ratos, demonstraram que períodos isquêmicos mais prolongados estavam diretamente relacionados a um aumento na proporção de células mortas. Para tal, utilizaram um modelo de isquemia hipotérmica com diferentes tempos de preservação (20 minutos, 6, 12, 18 e 24 horas) seguidos pelo transplante pulmonar e conseqüente reperfusão. Demonstraram que em 20 minutos, 6 e 12 horas de isquemia fria havia até 2% de morte celular o que não evidenciava-se no período de 18 e 24 horas, onde, respectivamente haviam 11% e 27% de células mortas, sendo na sua maioria devido a necrose celular. Após o transplante pulmonar, os grupos de 6 e 12 horas apresentaram 30% de células apoptóticas e menos de 2% de necrose celular, entretanto aqueles pulmões armazenados por 18 e 24 horas

apresentaram 29% de células necróticas e 1% de apoptose celular. Os autores observaram neste estudo, um decréscimo significativo e gradativo na função pulmonar a medida que aumentava o tempo de preservação. Sugerindo assim uma correlação positiva entre o tempo de preservação, tipo de morte celular e desempenho funcional do órgão (18). Segundo Yamane et al. (19), a resposta inflamatória pós-transplante depende do tempo de isquemia. Existem diferenças significativas na expressão gênica entre curtos e longos períodos de isquemia seguidos pela reperfusão do enxerto. Por exemplo, muitos genes envolvidos na resposta inflamatória, como citocinas e quimioquinas tendem a ter um aumento da sua expressão em 24 horas quando comparados a 6 horas de isquemia fria. Foi observado neste estudo que muitos genes estavam relacionados ao processo de apoptose (19).

A morte celular programada classicamente referida como apoptose, é processo dependente de energia e substrato envolvendo a cascata das caspases, enzimas e processo mitocondrial. Em contraste, necrose é uma forma de morte celular acompanhada por perda da integridade da membrana e ruptura nuclear (19, 20). A diferenciação da função pulmonar pode ser dependente destes processos como o estabelecido por Quadri et al.(20), que ao avaliarem o efeito da caspase em períodos curtos (6 horas) e longos (18 horas) de isquemia fria, observaram um aumento significativo na atividade das caspases 8 e 9 sugerindo o envolvimento de vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas neste processo. Demonstraram também que elas seriam ativadas precocemente no processo do transplante e que a apoptose celular poderia ser inibida reduzindo assim a injúria por reperfusão e melhorando a função pulmonar (20).

A lesão de reperfusão pós transplante pulmonar é bifásica, apresentando uma fase precoce (30 minutos) que é mediada inicialmente pela resposta imune inata através da ativação de macrófagos alveolares no pulmão do doador com conseqüente produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral alfa. Enquanto que na fase tardia (6 horas após reperfusão) ocorre um da resposta celular mais organizada através da ativação do sistema do complemento e linfócitos T (4). Ambas as fases contribuem para uma exacerbação da resposta inflamatória resultando em morte celular principalmente devido a estimulação das células apoptóticas (4, 18, 19). Esta indução a resposta inflamatória e a apoptose pode ser mediada pelo fator de transcrição nuclear kappa beta (NF- κ B), isto evidencia-se no estudo de Ishiyama et al. (21), demonstraram que a inibição do NF- κ B com terapia gênica preveniu a indução da apoptose e diminuiu a lesão de isquemia-reperfusão em modelo experimental de transplante pulmonar em roedores. Sugerindo assim que o NF- κ B seria o fator de responsável pela ativação da lesão pulmonar pós-transplante por atuar como fator promotor da morte celular por vias apoptóticas (20). Na cascata de sinalização do estímulo inflamatório, o NF- κ B apresenta papel fundamental, uma vez que quando transcrito para o núcleo celular resulta em estimulação da resposta inflamatória, principalmente através da produção de interleucina-8 (21).

Baseados na hipótese de que o perfluorocarbono líquido pode influenciar o tempo de preservação pulmonar, utilizamos um modelo experimental de isquemia e reperfusão pulmonar e outro de transplante pulmonar para definir como seria o comportamento dos pulmões tratados com perfluorocarbono

endobrônquico em relação a atividade inflamatória, presença de apoptose e estresse oxidativo.

2. Referencial Teórico

2.1 Histórico dos Transplantes Pulmonares

As primeiras tentativas experimentais de realização de transplante pulmonar isolado datam da década de 1940, quando Demikhov realizou os primeiros homoenxertos pulmonares em cães. Após três anos, Metras publicou o primeiro relato da técnica de alotransplante pulmonar em cães, tendo este somado muitos esforços para a consolidação dos princípios técnicos iniciais que nortearam os transplantes pulmonares, entretanto pouco era conhecido a respeito da fisiologia do enxerto e dos danos causados pela isquemia e reperfusão (1,2).

O primeiro transplante clínico foi realizado em 1963 por Hardy (22) utilizando um pulmão extraído após a morte de um paciente vítima de infarto agudo do miocárdio que evoluíra para choque cardiogênico e edema pulmonar. O pulmão esquerdo foi extraído imediatamente após a morte clínica do doador e transplantado num receptor de 58 anos portador de carcinoma brônquico com metástases linfonodais. O receptor foi submetido a tratamento com antibióticos no pré-operatório com resposta clínica parcial, entretanto, o paciente sobreviveu 18 dias após o transplante, falecendo em virtude de insuficiência renal, desnutrição e infecção. Interessantemente, a autópsia não demonstrou nenhuma evidência de rejeição no enxerto pulmonar. A imunossupressão na

época consistia de azatioprina, prednisona e radioterapia mediastinal. Nos vinte anos seguintes, foram realizadas 22 tentativas de transplante pulmonar clínico em diversos centros sem êxito, com exceção de um único caso relatado por Derom e colaboradores (23) em um paciente portador de silicose que sobrevivera dez meses após um transplante pulmonar unilateral, sucumbindo em virtude de uma pneumonia.

Já em 1978 o primeiro transplante pulmonar unilateral foi realizado em um paciente portador de um severo dano pulmonar causado por queimaduras na via aérea secundárias a inalação de fumaça, o qual não obteve-se sucesso. O paciente faleceu no 17º dia de pós-operatório devido à necrose e deiscência da anastomose brônquica (24). Mais tarde, concluiu-se que a causa provável da necrose seria o uso de altas doses de corticosteróides no esquema de imunossupressão (100 mg de prednisona/dia), após o transplante.

Estudos experimentais subsequentes os quais analisaram a cicatrização brônquica concluíram o que o retardo na utilização de prednisona no pós-operatório do transplante pulmonar reduziriam significativamente o risco de complicações anastomóticas. Estes achados cunharam as bases para modificações técnicas e estratégicas que motivaram a realização do transplante em um paciente portador de intoxicação por paraquat. O paciente faleceu 3 meses após o transplante em ventilação mecânica devido a progressão da miopatia pelo paraquat e falência de múltiplos órgãos (25).

Após um longo período de pesquisas e reavaliação da seleção dos receptores e da técnica cirúrgica, em 1983 na cidade de Toronto no Canadá, o primeiro transplante pulmonar unilateral realizado com sucesso em um paciente de 58 anos portador de fibrose pulmonar (26). O paciente recebeu alta

hospitalar 6 semanas após o transplante e retornou à vida produtiva, sendo este considerado o “marco zero” do transplante pulmonar clínico realizado com sucesso. Todas as modificações técnicas, do manuseio clínico, seleção de doadores e receptores advieram desta experiência inicial.

2.2 Estado Atual da Doação de Órgãos no Brasil e Manutenção dos Receptores

Os órgãos utilizados para transplante podem ser captados de doador vivo, doador cadáver e doador em morte encefálica. A doação de rim, de medula óssea e o transplante inter-vivos de fígado (27, 28) e pulmão (29-31) são exemplos de captação de doadores vivos. A doação de córnea, osso e pele são os principais exemplos relacionados ao doador cadáver. No entanto, a captação de rins (32, 33), fígado (34, 35) e até mesmo pulmões (36-38) tem sido utilizada recentemente em doadores após parada cardiorrespiratória (*non-heart-beating donors*). No nosso meio, a grande maioria dos órgãos são captados de doadores em morte encefálica antes da parada cardiorrespiratória (*heart-beating brain dead donors*).

Apenas os estados do Rio Grande do Sul e São Paulo possuem programas atuantes em transplante pulmonar, sendo responsáveis por 22 transplantes de doadores cadáveres no primeiro trimestre de 2010, segundo o Registro Brasileiro de Transplantes publicado pela Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). (39)

A ABTO rege algumas orientações básicas em relação a manutenção do doador cadáver: (a) garantia de acessos vasculares; (b) tratamento de

hipotensão com reposição volêmica rigorosa (cristalóides e colóides), uso de dopamina ou outra droga vasoativa; (c) Ventilação com volume inspiratório de 10ml/Kg de peso, PEEP de 5 cmH₂O e gasometria arterial periódica; (d) Controle de hipotermia com focos de luz próximo ao tórax e abdome, infusão e ventilação aquecidos e cobertor térmico; (e) outros cuidados tais como reposição de eletrólitos, reposição de bicarbonato de sódio em acidose metabólica, correção de hiperglicemia com insulina regular, uso regular de antibióticos profiláticos e terapêuticos, transfusão de sangue quando hemoglobina abaixo de 10 g/dl e proteção ocular com gaze umedecida (40).

2.3 Histórico da Preservação Pulmonar

A consolidação dos transplantes pulmonares clínicos resultou na realização de novas pesquisas relacionadas a manutenção da viabilidade do enxerto, em particular no mecanismos de controle da rejeição e integridade das anastomoses das vias aéreas.

Com o decorrer do tempo houve a proliferação dos programas de transplante pulmonar a procura de órgãos a distância e os transplantes até então realizados com doadores no próprio centro, passaram a ter a necessidade de captação de potenciais doadores a distância.

A proliferação dos programas de transplante fez com que as listas de espera crescam e a mortalidade dos candidatos em lista findou por ditar uma profunda reestruturação nos critérios de seleção de doadores e obtenção de órgãos para atender esta demanda. Este problema não está resolvido apesar de enormes esforços empreendidos, a necessidade de preservarem-se os enxertos pulmonares de forma segura por períodos mais longos permite a

busca de órgãos à distância, oferecendo assim uma solução paliativa para a situação. O tempo de isquemia passou a ser a principal questão a ser respondida. O limite inicial de isquemia normotérmica, inicialmente de 4 horas, foi estabelecido ainda em 1952 através de estudos experimentais em cães por Blades (41). No ano seguinte, o mesmo investigador demonstrou o significativo comprometimento da capacidade de troca gasosa nos pulmões de cães quando submetidos a 90 minutos de isquemia normotérmica (42). Homatas e colaboradores em 1968 (43) estudaram pulmões caninos extraídos após parada cardio-circulatória em períodos de até 6 horas. Esses autores demonstraram em modelo de perfusão isolada do pulmão que, após 2 horas de isquemia observava-se clara deterioração das trocas gasosas pulmonares secundárias ao aparecimento de severo edema pulmonar. Este limite de tolerância isquêmica de 2 horas foi confirmado posteriormente em 1971 por Veith e colaboradores (44), através da utilização de um modelo de isquemia normotérmica pulmonar *in situ*. A partir desses estudos ficou claro que o limite de tolerância à isquemia dos pulmões era diferente dos demais órgãos sólidos, limitando sobremaneira sua utilização segura em condições de isquemia normotérmica em períodos superiores a 2 horas após sua extração.

No princípio dos estudos de preservação pulmonar, pouco se conhecia a respeito de métodos de controle da lesão de reperfusão, por este motivo, algumas alternativas foram baseadas em alterações similares ocorridas em órgãos sólidos, como o coração (45) onde as definições de hipotermia na década de 1950, cunharam os princípios até hoje utilizados na cirurgia cardíaca moderna. Assim sendo, a hipotermia foi incorporada precocemente como método de preservação pulmonar presente em todas as modalidades de

preservação em uso clínico até os dias atuais. De início, os métodos de produção da hipotermia pulmonar variaram desde a imersão simples com o pulmão desinsuflado, resfriamento central do doador através de circulação extra-corpórea com hipotermia profunda (46), até o método mais utilizado na atualidade representado pela perfusão pulmonar com solução hipotérmica. Este método de preservação pulmonar originou-se em um relato clínico (47) de perfusão do enxerto pulmonar esquerdo com solução cristalóide (Ringer lactato) a 4°C. Inúmeras soluções de preservação foram e tem sido propostas, entretanto, apenas algumas delas ganharam uso clínico corrente. Atualmente, a preservação pulmonar tem se beneficiado das novas tecnologias de manipulação e terapia genética, as quais encontram-se em fases avançadas de experimentação devendo ser anexadas ao uso clínico corrente num futuro próximo.

Durante estes quase 50 anos de pesquisas ininterruptas muito se atingiu no que se refere aos aperfeiçoamentos técnicos, seleção de doadores/receptores, imunossupressão e resultados clínicos. Entretanto, os avanços obtidos na preservação do enxerto ainda são modestos se comparados aos dos demais órgãos sólidos, haja visto a indisponibilidades de métodos que permitam períodos prolongados de isquemia. Isto se deve à complexidade fisiológica do pulmão e a sua extrema suscetibilidade a lesão isquêmica cujo produto final será a alteração da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, transudação do conteúdo vascular para o interstício com consequente edema e prejuízo das trocas gasosas. Não obstante, a necessidade de encontrarem-se novas opções de preservação do enxerto é atual e premente, uma vez que o suprimento cada vez menor de doadores para

a demanda de receptores exerce pressão permanente sobre os centros de transplante forçando-os à rever constantemente os critérios de seleção e a procurar alternativas para a doação de órgãos. O resultado tem sido a inclusão de doadores considerados não ideais ou limítrofes. Estes fatos adicionados à indisponibilidade crescente de órgãos para retransplantes em casos de falência aguda do enxerto transformaram a preservação do enxerto em componente vital para o sucesso dos transplantes. Por fim, todos estes fatores transformaram o ato da extração pulmonar em si por vezes mais crítico do que o próprio implante do enxerto no receptor, uma vez que uma simples falha técnica no momento da perfusão pulmonar com solução preservadora será capaz de inviabilizar o enxerto num curto espaço de tempo após o seu implante no receptor, bem como proporcionar condições para o aparecimento de complicações ulteriores (por exemplo, isquemia da anastomose da via aérea, infecções).

2.4 Perfusão Pulmonar Ex-Vivo

Várias estratégias têm sido empregadas com o intuito de aumentar o pool de doadores. Alguns centros utilizam doadores vivos relacionados, enquanto outros utilizam doadores já em parada cardíaca, entretanto, apesar da comprovada eficácia destas medidas (48-51), apenas um limitado número de pacientes pode se beneficiar em decorrência de limitações técnicas, éticas e médicas. Esta persistente escassez de doadores levou a uma reavaliação do pool de doadores já disponível. Os critérios adotados atualmente têm o objetivo de selecionar o doador ideal e datam dos trabalhos iniciais de transplante pulmonar em humanos. Entretanto, uma reavaliação destes critérios mostra

que eles são arbitrários e não baseados em evidências científicas sólidas. Com os avanços na preservação de órgãos houve a expansão dos critérios de seleção, quando o termo “doador marginal” foi cunhado. O aproveitamento desse grupo de doadores possibilitou o aumento no aproveitamento de órgãos de doadores para até 40%.

Entretanto, apesar do aumento no número de doadores (52), alguns estudos empregando o uso liberal de doadores marginais mostraram piores resultados em termos de tempo de permanência em UTI, elevada mortalidade e piora funcional espirométrica em 1 ano pós-transplante (53-55). Portanto, cada doador é selecionado de maneira cuidadosa e avaliado individualmente, sendo que o risco da utilização de um doador marginal deve sempre ser considerado em relação ao risco de morte enquanto na lista de espera. Uma avaliação pormenorizada do pulmão do doador é um elemento fundamental no momento da seleção. Infelizmente, a predição de resultados pós-transplante utilizando critérios clínicos do doador é imprecisa. Além disso, alguns critérios como radiograma de tórax e achados de broncoscopia são bastante subjetivos (56). Essa subjetividade e falta de acurácia leva por vezes à utilização de pulmões com algum grau de injúria não reconhecida, fato esse que pode se traduzir como maus resultados pós-transplante, principalmente decorrente de disfunção primária do enxerto. Ainda, é estimado que 40% dos pulmões que são rejeitados baseados em dados clínicos poderiam ser utilizados seguramente caso uma forma de avaliação mais precisa e detalhada fosse empregada (57). Esse percentual certamente seria bastante significativo, trazendo importante aumento de disponibilidade de órgãos.

A manutenção da viabilidade dos órgãos durante a fase de preservação é um importante pré-requisito para o sucesso nos desfechos pós-transplante. A preservação a frio foi desenvolvida em uma era de doadores mais jovens e com órgãos de melhor qualidade. Com a prática atual em aceitar órgãos de pacientes mais idosos e mais lesados, tornou-se uma necessidade conseguir desenvolver métodos alternativos de melhorar a maneira de preservação e o próprio órgão. Idealmente, um bom método de preservação deveria facilitar o uso de órgãos marginais e promover a verificação de sua viabilidade pré-transplante. A preservação hipotérmica usada rotineiramente inibe o metabolismo celular e elimina a possibilidade da ocorrência de processos reparativos substanciais após haver lesão no órgão doado. Por essas razões, a perfusão ex-vivo normotérmica (37°C) ou quase-normotérmica (25 - 34°C) tem se tornado popular como método de preservação alternativo para transplante de fígado e rins.

Preservação pulmonar ex-vivo não é um conceito novo, e tem sido usada amplamente para estudos de função pulmonar em animais de pequeno porte. Contudo, tentativas de preservação pulmonar com máquinas falharam no passado, principalmente pelo desenvolvimento de edema pulmonar e aumento na resistência vascular pulmonar. Motivados a usarem pulmões de doadores com o coração já parado, Steen e colaboradores, descreveram um sistema de preservação ex-vivo a fim de avaliar a função pulmonar desses pulmões, que de outra parte não poderiam ser avaliados in vivo. Esse grupo fez uma contribuição significativa desenvolvendo um solução (solução de Steen) que permitiu que fosse feita preservação pulmonar ex-vivo sem desenvolver edema pulmonar. Após período curto de avaliação ex-vivo (60-90 minutos), eles

mostraram que esse pulmão poderia ser transplantado com sucesso em animais de grande porte e descreveram seu uso em transplante de pulmão em humano em um relato de caso.

Após essa publicação, outros grupos demonstraram a factibilidade da preservação pulmonar ex-vivo (EVLP) por períodos curtos visando avaliar a função pulmonar em modelos animais de doação após parada cardíaca e em pulmões humanos rejeitados para transplante. Adicionalmente, estenderam a preservação pulmonar para 6 horas. Apesar de ser possível, essa preservação ex-vivo piorou a função pulmonar, demonstrável pelo aumento da resistência vascular pulmonar e aumento na pressão nas vias aéreas no final do procedimento. Cabe ressaltar que esses estudos não testaram a correlação dos achados de ex-vivo com os desfechos pós-transplante (devido ao fato desses pulmões submetidos a EVLP não serem transplantados). Portanto, a evidência atual tem demonstrado que pulmões doados podem ser perfundidos de forma segura por mais de duas horas, todavia, essa técnica usada por períodos mais longos leva a deterioração da função pulmonar. Isso é mais evidente quando pulmões previamente lesados (por isquemia) são submetidos a EVLP, então, nota-se aumento significativo nas pressões em vias aéreas e na resistência vascular pulmonar quando observados após 90 minutos de perfusão.

Utilizando um modelo modificado de perfusão ex-vivo, o grupo de Toronto tem estudado sistematicamente uma forma alternativa de perfusão que possibilita manter os pulmões em normotermia sem causar injúria. Dados pré-clínicos mostraram que o uso da solução de Steen é seguro e que a função pulmonar pós-transplante em suínos foi excelente. Além disso, esse método

também foi utilizado para tratar e avaliar o pulmão de 15 doadores considerados não adequados com base nos critérios vigentes. Este estudo demonstra que os receptores destes órgãos não apresentaram quaisquer diferença quando comparados com os receptores de órgãos considerados adequados para transplante (58).

2.5 Líquidos de Preservação Pulmonar

Apesar de várias décadas de estudo, ainda não existe uma solução de preservação pulmonar considerada como ideal. A solução de preservação que apresentasse os seguintes requisitos seria aquela que teoricamente apresentaria os melhores resultados, tais como:

- 1) Deve ser isosmótica, desta forma não alteraria a permeabilidade da membrana celular;
- 2) Possuir potencial de tamponamento, neutralizando assim a acidose tecidual ocasionada pela lactacidemia e por acúmulo de metabólitos durante a fase isquêmica;
- 3) Conter um doador energético (glicose, por exemplo) a fim de manter o funcionamento celular adequado durante o período de preservação;
- 4) Fluidez na circulação pulmonar, distribuindo-se de forma uniforme na circulação pulmonar;
- 5) Apresentar componentes eletrolíticos a fim de manter a troca através da membrana celular;

As soluções de preservação podem ser divididas em dois tipos, as intracelulares e extracelulares, conforme a concentração de Na^+ e K^+ . Nas denominadas intracelulares, sua tendência em permanecer no citosol é função de uma alta concentração de K^+ e baixa concentração de Na^+ que mimetizam as concentrações eletrolíticas no ambiente intracelular.

A composição das soluções extracelulares utilizam-se da ordem inversa das concentrações destes eletrólitos, tendendo assim à permanecer fora da célula. As soluções intracelulares foram introduzidas inicialmente baseadas no princípio de que a permanência da solução dentro da célula seria desejável uma vez que os danos causados pela isquemia e baixas temperaturas à bomba de íons podem resultar em acúmulo de água no citosol e consequente ruptura da membrana celular. Sendo assim, a permanência dos eletrólitos da solução no interior da célula promoveriam uma estabilização da bomba e, indiretamente, da membrana celular. Nos pulmões, tais propriedades seriam fundamentais uma vez que a estabilização da membrana endotelial vascular é fator determinante da viabilidade do enxerto. Em contrapartida, as altas concentrações de K^+ das soluções intracelulares possuem uma ação vasoconstrictora direta sobre a circulação pulmonar. Embora também possa ocorrer em outros órgãos, este efeito é mais notável nos pulmões devido à peculiar e extrema sensibilidade de sua extensa vasculatura às variações de temperatura e das concentrações eletrolíticas, dentre outros fatores. Esta característica é indesejável pois resulta em distribuição irregular da solução nos pulmões.

As soluções extracelulares advieram inicialmente da necessidade de evitarem-se estes efeitos vasomotores. A redução da resistência vascular

pulmonar é uma propriedade evidente ao observar-se a rapidez e baixas pressões com as quais as soluções extracelulares fluem através da circulação pulmonar resultando em resfriamento regular, uniforme e remoção eficaz do sangue da periferia dos pulmões. Estas propriedades tem tornado as soluções extracelulares cada vez mais utilizadas clínica e experimentalmente na preservação de pulmões para transplante.

2.6 Soluções de Preservação Estudadas em Transplante Pulmonar

2.6.1 Euro-Collins

Solução hipertônica com componente eletrolítico de natureza intracelular, utilizada com sucesso na preservação de rins em períodos de isquemia hipotérmica de até 30 horas (59). Em 1986, Starkey e colaboradores (60) relataram seu sucesso com a preservação de blocos cárdio-pulmonares de primatas por 6 horas através da perfusão com solução de Euro-Collins (60ml/kg de peso corporal) pela artéria pulmonar seguidas de armazenamento estático sob hipotermia. Baldwin e colaboradores (61) aplicou esta técnica de perfusão com a mesma solução clinicamente com sucesso em transplantes cárdio-pulmonares destacando a necessidade e exequibilidade da procura de órgãos à distância por este método. Um estudo em cães realizado no ano seguinte por Locke e colaboradores (62) descreveu a superioridade da preservação pulmonar obtida através da perfusão com solução de Euro-Collins quando comparada com a imersão hipotérmica simples em períodos de isquemia de

até 6 horas, fundamentando as bases para uso clínico da solução de Euro-Collins na preservação pulmonar. Em 1990, Kirk e colaboradores (63) relataram sua experiência clínica com 20 transplantes pulmonares realizados utilizando enxertos preservados por perfusão com solução de Euro-Collins modificada (adição de MgSO_4 mmol/L) precedida de vasodilatador pulmonar (prostaciclina, 20 dg/L). O tempo médio de isquemia foi de 200 minutos. Dois receptores apresentaram disfunção severa do enxerto atribuível pelos autores ao fato destes terem sido grandes fumantes e possuírem idade superior a 40 anos. Os 18 pacientes restantes apresentaram evolução satisfatória com gradientes A-aO₂ declinando desde o pós-transplante imediato, antes da extubação e na primeira semana pós-transplante (respectivamente, 253mmHg, 11mmHg e 29mmHg). A solução de Euro-Collins modificada pela adição de MgSO_4 permanece sendo utilizada em vários centros de transplante pulmonar.

2.6.2 Belzer-UW

Em 1986 Belzer (64) introduziu uma nova solução de preservação originalmente desenhada para o fígado. Sua composição intracelular baseia-se no uso de rafinose e lactobionato que são substâncias capazes de suprimir o edema intracelular causado pela isquemia hipotérmica. O autor acrescentou um captador de radicais livres, glutathione, adenosina dentre outros elementos. Os resultados experimentais demonstraram que esta solução era capaz de preservar fígados de cães por períodos de isquemia hipotérmica de até 48 horas e pâncreas por até 72 horas. A possibilidade de que a utilização desta solução para preservação pulmonar passou a ser considerada a partir da possibilidade de utilização de um composto com características extracelulares.

Um estudo experimental com perfusão parabiótica pulmonar em ratos comparando a solução UW com Euro-Collins (65) revelou a superioridade da solução UW. A partir daí os relatos de preservação pulmonar com solução UW têm se multiplicado. Bresticker e colaboradores (66) testaram esta solução em modelo de transplante pulmonar canino no qual foram perfundidas as circulações pulmonar e brônquica, concluindo pela superioridade da solução UW intracelular após 17 horas de isquemia hipotérmica (4°C).

2.6.3 Low Potassium Dextran - LPD

As dificuldades inerentes ao uso de soluções intracelulares para perfusão pulmonar tais como a vasoconstrição, criaram a necessidade do desenvolvimento de soluções específicas para o pulmão. Em 1985, Fujimura e colaboradores (67) demonstraram a superioridade de uma solução extracelular para a preservação de pulmões caninos transplantados após 24 horas de isquemia hipotérmica. Dois anos mais tarde, o mesmo autor (68) relatou o sucesso com preservação pulmonar hipotérmica de até 48 horas em um modelo canino de transplante pulmonar unilateral, utilizando soluções extracelulares contendo tampões fosfatados e 2% de dextran com baixo peso molecular. Em um estudo realizado na Universidade de Toronto demonstrou que a concentração de potássio da solução de Euro-Collins era o responsável pelas dificuldades e má qualidade da perfusão e preservação dos pulmões. A partir destas informações, desenvolveu-se uma solução contendo baixo teor de potássio e dextran-40 (LPD - Low Potassium Dextran) baseada na solução proposta por Fujimura. Num modelo experimental em coelhos, Yamazaki e colaboradores (69) demonstraram a superioridade do LPD sobre a solução de

Euro-Collins em pulmões preservados por 18 horas a 10°C. Keshavjee e colaboradores (17) descreveram resultados funcionais superiores em pulmões perfundidos com solução LPD e submetidos a isquemia hipotérmica (4°C), por 12 horas, quando comparados com pulmões preservados com solução de Euro-Collins. A partir deste estudo foi esclarecido alguns pontos fundamentais como o fato de que as soluções extracelulares eram capazes de preservar pulmões de maneira consistente e por períodos mais longos quando comparadas a outras soluções. A presença de um tampão fosfato diminui a acidose tecidual que ocorre naturalmente durante os períodos de isquemia. A adição de dextran-40 funciona como substância oncoticamente ativa, produzindo uma tendência de manutenção da água no compartimento intravascular reduzindo assim o edema intersticial. Outras propriedades da substância incluem o aumento da deformabilidade e desagregação dos eritrócitos, facilitando assim seu trânsito pela microcirculação (70). Demonstrou-se ainda que a viabilidade brônquica superior ao nível das anastomoses nos animais que haviam recebido soluções de perfusão contendo dextran-40. Estes achados consolidaram a utilização deste tipo de solução para preservação pulmonar em uso clínico atual, comercializada sob nome de Perfadex® (Biophausia-Suécia).

2.6.4 Celsior

A solução de Celsior foi introduzida experimentalmente para perfusão pulmonar. Estudos preliminares em um modelo experimental em ratos utilizando perfusão pulmonar isolada em enxertos submetidos a 4 horas de isquemia hipotérmica (4°C), revelou a capacidade desta solução em reduzir a

permeabilidade vascular pulmonar durante a reperfusão (71). A comparação da solução de Celsior com Euro-Collins e UW em modelo similar de perfusão isolada em pulmões submetidos a 6 e 12 horas de isquemia hipotérmica (4°C) de ratos demonstrou que os pulmões preservados com a solução Celsior apresentavam melhor oxigenação após serem reperfundidos, reduzida permeabilidade capilar pulmonar, ambos mais evidentes após 12 horas de isquemia (72). Fehrenbach e colaboradores (73) compararam o desempenho de pulmões de ratos submetidos a 2 horas de isquemia hipotérmica (4°C), comparando Celsior com Euro-Collins com baixo teor de potássio e concluíram que a oxigenação pós-reperfusão era significativamente superior nos pulmões que haviam recebido a solução de Celsior. Wittwer e colaboradores (73) estudaram o desempenho de ambas as soluções em um modelo de perfusão extra-corpórea de pulmões de ratos submetidos a duas e 4 horas de isquemia. Concluíram que tanto Perfadex[®] quanto Celsior possuíam resultados comparáveis no tocante à oxigenação sanguínea até 2 horas, entretanto após 4 horas os pulmões preservados com Perfadex[®] sofreram severo dano isquêmico e elevação da pressão arterial pulmonar, fatos estes que não ocorreram nos pulmões preservados com Celsior. Os autores concluíram que a solução de Celsior conferiria efeitos protetores mais duradouros em períodos isquêmicos mais longos. Devido a sua capacidade peculiar de servir à preservação tanto de enxertos cardíacos como pulmonares. Apesar dos resultados experimentais otimistas, a solução Celsior ainda carece de confirmação clínica em estudos prospectivos para a sua consolidação como alternativa para preservação pulmonar de uso corrente nos centros de transplante.

2.7 Disfunção Primária do Enxerto

A disfunção primária do enxerto é uma forma de dano pulmonar agudo que resulta de uma seqüência de eventos inerentes ao processo do transplante pulmonar como a morte cerebral do doador e os eventos relacionados diretamente ao enxerto como isquemia, preservação, transplante e reperfusão. Apesar de numerosos recentes avanços em preservação pulmonar, técnica cirúrgica e cuidados peri-operatórios, a disfunção do enxerto no pós-transplante ainda é prevalente com incidência entre 11% e 25%. (74-76)

Vários termos descrevem essa situação clínica tais como lesão de isquemia e reperfusão, resposta pós-implante, edema pós-implante, edema de reperfusão, edema pulmonar não cardiogênico, disfunção precoce do enxerto, disfunção primária do enxerto, falência primária do enxerto, síndrome da distrição respiratória aguda pós-transplante e dano pulmonar agudo. Essas expressões não são sinônimos sendo algumas utilizadas para descrever o evento terminal do dano de isquemia-reperfusão e outras referem-se a quadros clínicos menos graves (77). Mesmo com as variações presentes entre os estudos existe consenso que a disfunção primária do enxerto é responsável por grande morbidade e mortalidade no transplante pulmonar. (78)

Idade, raça, sexo, história de tabagismo e doença pulmonar subjacente são características do doador que podem influenciar na qualidade do enxerto. Além disso, outros fatores presentes no doador como morte cerebral, ventilação mecânica prolongada, aspiração brônquica, pneumonia, trauma, politransfusão e instabilidade hemodinâmica contribuem para o dano pulmonar

resultante da isquemia e reperfusão e, conseqüentemente, para a disfunção do enxerto. (79, 80)

Dessa forma, o tratamento e, principalmente, a prevenção da disfunção primária do enxerto são abordagens de suma importância no atual contexto dos programas de transplante pulmonar.

2.8 Lesão de Reperfusão Pulmonar

A lesão de reperfusão compreende uma série de fenômenos que decorrem da recirculação do sangue (reperfusão) em um órgão cuja circulação sanguínea tenha sido interrompida temporariamente (isquemia). O produto final desta sequência de eventos será a alteração da permeabilidade capilar cuja graduação será diretamente proporcional ao grau do dano isquêmico o qual, por sua vez, pode variar de um simples edema intersticial até a ruptura vascular com hemorragia. Apesar de todos os avanços atingidos nos transplantes pulmonares, cerca de 20% da mortalidade logo após o transplante é causada por mecanismos que envolvem a lesão de reperfusão (38). Sabe-se hoje que a chamada toxicidade pelo oxigênio desempenha papel fundamental na gênese e manutenção da lesão de reperfusão. Este conceito já havia sido sugerido em 1954 por Gerschman e colaboradores (81) através da proposta de um denominador comum entre o chamado "envenenamento pelo oxigênio e a irradiação X", representado pelo papel dos metabólitos do oxigênio, em particular o radical hidroxila (OH^-), tóxico e produzido dentro da célula durante a reoxigenação dos tecidos. A analogia baseava-se no fato de que a ação da radiação ionizante atuaria sobre a água contida nos tecidos degradando-a em hidrogênio e produzindo o radical hidroxila. A compreensão dos mecanismos

envolvidos na toxicidade pelo oxigênio só cerca de trinta anos após o relato inicial de Gerschman, quando em 1985 McCord (82) propôs e explicou a ação dos metabólitos de oxigênio durante o período de reperfusão de tecidos isquêmicos através da produção dos chamados radicais livres de oxigênio. O conhecimento desses mecanismos revolucionou a fisiopatologia da lesão de reperfusão, abrindo caminho para as pesquisas orientadas aos métodos de controle cujo impacto nos transplantes já se faz notar na literatura.

2.9 Estresse Oxidativo e Lesão de Isquemia-Reperfusão

No ano de 1981, Granger e colaboradores publicaram um dos primeiros estudos o qual demonstrou a participação do radical superóxido (O_2^-) na lesão isquêmica através de um modelo de isquemia intestinal em gatos (85).

Demonstra-se que há diferentes vias de produção das ERO, destacando-se a via da xantina-oxidase como fonte primária de produção na maioria dos órgãos com vascularização sistêmica (82). Na matriz mitocondrial, através da cadeia de transporte de elétrons também ocorre a formação de ERO pela redução do oxigênio molecular a O_2^- (87).

Durante a isquemia tecidual, ocorre uma redução da disponibilidade do trifosfato de adenosina (ATP) em decorrência da sua degradação em difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP), adenosina, inosina e finalmente hipoxantina. Além disso, ocorre a conversão da xantina-desidrogenase em xantina-oxidase. Essa reação pode ocorrer por dois mecanismos: 1) a xantina-desidrogenase pode ser reversivelmente convertida para xantina-oxidase por oxidação de grupos sulfidrilas ou 2) a xantina-desidrogenase pode ser irreversivelmente convertida para xantina-oxidase por

proteólise, através de proteases ativadas pelo cálcio que está aumentado no citosol, oriundo do meio extracelular. (88, 89)

Ao contrário dos outros órgãos, o pulmão é considerado o único órgão que pode sofrer isquemia sem hipóxia, pois o oxigênio alveolar ajuda a manter o metabolismo aeróbico evitando hipóxia. Dessa forma, no pulmão o estresse oxidativo resultante da isquemia deveria ser diferenciado daquele resultante da hipóxia propriamente dita (80).

Há basicamente dois mecanismos que geram a produção de ERO, o primeiro seria aquele relacionado ao acúmulo de hipoxantina e a conversão de xantina desidrogenase em xantina oxidase durante a anóxia, e posterior degradação da hipoxantina em superóxido no momento da reoxigenação. (80) (figura 1).

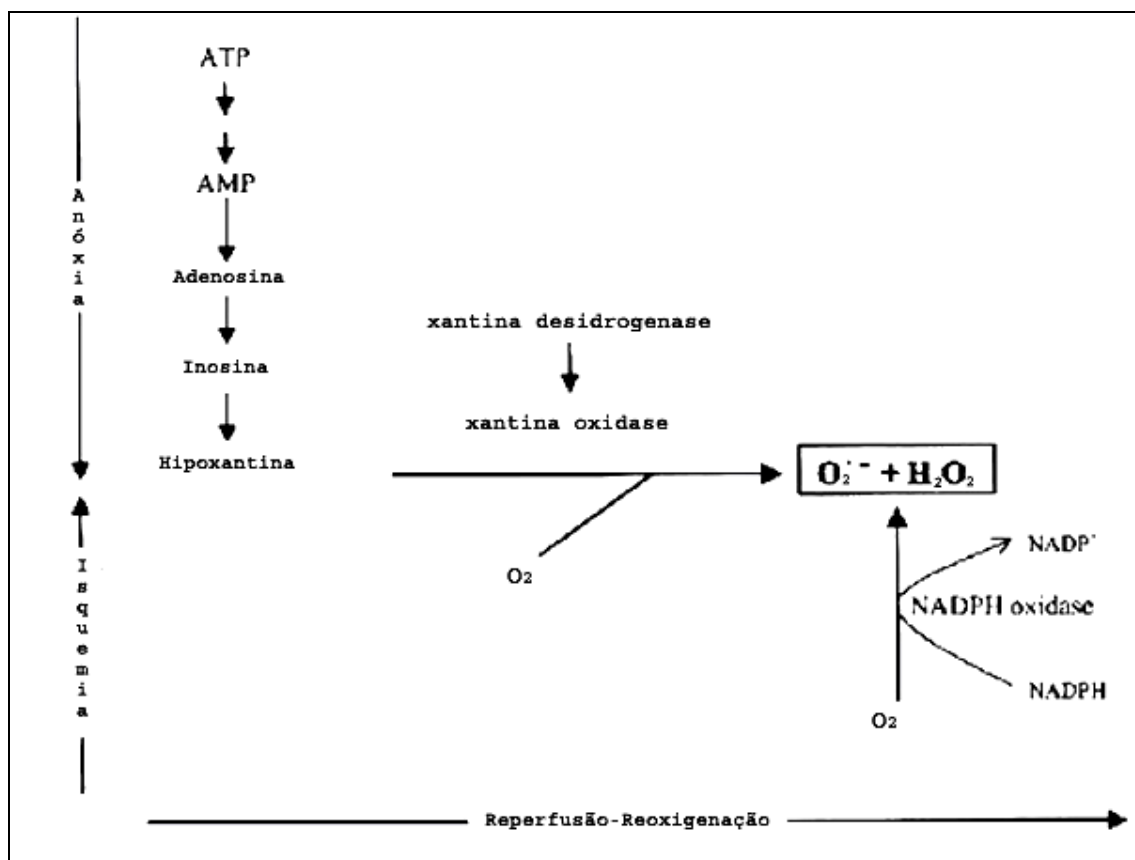


Figura 1. Formação de espécies reativas do oxigênio durante a isquemia-reperfusão e a anóxia-reoxigenação no pulmão. Modificado de de Perrot e cols.(80).

Em relação ao transplante pulmonar, fatores presentes na fase pré-reperfusão do enxerto como morte cerebral, pneumonia, ventilação mecânica, aspiração, contusão, hipotensão e isquemia fria têm sido reconhecidos como agravantes da lesão de isquemia-reperfusão através da ativação de fatores inflamatórios (80, 93).

Hipóxia e conseqüentemente anóxia resultam em decréscimo no ATP intracelular e aumento nos produtos de degradação do ATP como a hipoxantina, o que gera a produção de ERO quando o oxigênio é reintroduzido na perfusão e/ou ventilação. Durante a isquemia, esse fenômeno pode ocorrer no pulmão se a tensão de oxigênio alveolar cair abaixo de 7 mmHg (94) (95). A ausência de fluxo sanguíneo pulmonar leva a peroxidação lipídica mesmo com a presença de oxigênio. O mecanismo do estresse oxidativo é diferente do que ocorre durante a anóxia-reoxigenação porque não está associado a diminuição de ATP, podendo ocorrer mesmo durante o período de isquemia fria em um órgão acondicionado para transplante (96).

2.10 Sistema de Defesa Antioxidante

Antioxidante é uma substância que em pequenas concentrações é capaz de competir com outros substratos oxidáveis e dessa forma diminuir significativamente ou inibir a oxidação desses substratos. São exemplos de antioxidantes enzimáticos: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutaciona peroxidase (GPx), a GSH-redutase e de antioxidantes não

enzimáticos: o α -tocoferol (vitamina E), o β -caroteno, o ácido ascórbico (vitamina C) e a glutathiona (GSH) (86). Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a grande maioria dos agentes antioxidantes está presente no meio intracelular (84).

A glutathiona está presente na maioria das células do organismo, sendo o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula. A glutathiona peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois. A catalase é uma proteína cuja atividade é catalisar a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ . Três formas de SOD já foram identificadas no pulmão, a SOD-cobre-zinco, SOD-manganês e a SOD extracelular. (97) (98). Em relação às vitaminas, sabe-se que o β -caroteno interage com as ERO em baixa tensão de O_2 , já o α -tocoferol possui melhor função em alta concentração de O_2 . O ácido ascórbico é considerado um antioxidante hidrossolúvel capaz de neutralizar as ERO de forma direta, mas em dose elevada ou na presença de metal pode levar a lipoperoxidação (84).

2.11 Endotélio

A estimulação celular durante a isquemia resulta em translocação de componentes da NADPH oxidase para a membrana celular onde ocorre uma integração com componentes de membrana para formar um sistema de transferência de elétrons que catalisa a redução do oxigênio molecular (O_2) a superóxido (O_2^-), enquanto oxida o NADPH. O aumento no consumo de O_2 e na

produção de O_2^- são os responsáveis pela “explosão oxidativa” resultante da ativação da NADPH. O O_2^- pode ser posteriormente transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em reação catalisada pela superóxido dismutase. Os grânulos azurofílicos liberam a enzima mieloperoxidase (MPO) que durante ativação neutrofílica catalisa a reação entre o H_2O_2 e o cloro, produzindo ácido hipoclorídrico, considerado um oxidante extremamente potente. Além disso, o ácido hipoclorídrico pode reagir com as aminas gerando as cloraminas, consideradas potentes oxidantes. (100).

2.12 Apoptose e Lesão de Isquemia-Reperfusão Pulmonar

Diferentemente da necrose, a apoptose ou morte celular programada não está presente durante a isquemia, porém ocorre um pico de sua expressão durante a reperfusão (102). A indução de apoptose ocorre pela ativação e indução de duas vias, a intrínseca e extrínseca. A via intrínseca é dependente da mitocôndria, sendo ativada pelas ERO, enquanto a via extrínseca é dependente de moléculas inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), entretanto, ao ativar a produção de ERO pela via NADPH oxidase o TNF- α contribuiria também com a via intrínseca (103). Ambas as vias promovem a ativação de caspases, proteases responsáveis pela clivagem de substratos celulares específicos que resultam em alterações na conformação celular, alterações na membrana e fragmentação do DNA e conseqüente morte celular (104). A via intrínseca é ativada na fase precoce da reperfusão, já a via extrínseca pode ser ativada até algumas horas após a reperfusão pulmonar (105).

2.13 Mediadores Inflamatórios

2.13.1 Fator de Transcrição Nuclear kappa B

O Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF- κ B) é um fator de transcrição que desempenha importante e determinante papel, tanto em situações normais como na coordenação de respostas imunes adaptáveis, regulando a expressão de muitos mediadores celulares (87). Este fator foi descrito primeiramente em 1986 por Sen e Baltimore como sendo capaz de ligar-se a sítios específicos kappa como enhancer nas regiões promotoras dos genes das imunoglobulinas em células B (88). É reconhecido que o NF- κ B é expresso na maioria dos tipos celulares, sendo constituído por um dímero composto dos membros da família da Rel. Em células em homeostase o NF- κ B se mantém no citoplasma em sua forma inativa, associado com as proteínas inibidoras do sítio κ B, denominadas inibidores κ B (I κ B).

O NF- κ B pode ser ativado por uma variedade de sinais relevantes, conforme a etiologia e a fisiopatologia inflamatórias (87). Para sua ativação são necessários estímulos intracelulares e/ou extracelulares, podendo ser desencadeados pelos seguintes agentes: produtos bacterianos (endotoxinas, peptidoglicanos), vírus e componentes virais, protozoários, citocinas (fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas), radicais livres e/ou oxidantes (87).

Segundo Ishiyama e colaboradores (21) os quais estudaram a inibição da ativação do NF- κ B através da transferência de genes inibidores da forma supressora do inibidor I κ B evidenciaram o aumento na oxigenação do pulmão transplantado, redução do edema pulmonar e agregação neutrofílica assim

como a redução nas células apoptóticas após o transplante pulmonar experimental.

Desta forma, Chiang e colaboradores, demonstraram que a inibição do NF- κ B atenua a lesão de isquemia-reperfusão assim como era responsável pela redução na produção de citocinas. Em seu estudo, a ativação do NF- κ B foi responsável pelo aumento na expressão da caspase 3 e iNOS.

2.13.2 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador biológico produzido por vários tipos de células, inclusive o endotélio vascular. É considerado um mensageiro transcelular ideal por sua natureza lipofílica e pela curta meia-vida no sistema biológico, em torno de 3 a 30 segundos (106). O NO é sintetizado a partir da L-arginina, um aminoácido que é seu precursor natural, do oxigênio molecular, NADPH e outros co-fatores pela ação da enzima óxido nítrico-sintetase (NOS) (107). Além da sua potente ação vasodilatadora é um inibidor da agregação plaquetária e da aderência neutrofílica e modulador da permeabilidade vascular. Além disso, possui ações como broncodilatador e neurotransmissor (108).

Após a isquemia-reperfusão pulmonar, o nível de NO endógeno é reduzido. Esse efeito pode estar associado ao aumento da expressão da NOS endotelial, o que sugere que o NO endógeno produzido pode ser destruído rapidamente por ERO após a reperfusão, e/ou porque a isquemia-reperfusão pode induzir a geração de inibidores de NOS (109). A diminuição da produção do NO endógeno pela reação imediata do NO com o radical superóxido resulta

na produção de um poderoso oxidante, o peroxinitrito (OONO^{\cdot}). Essa perda da ação protetora do NO resultará em disfunção endotelial (106).

O uso de NO como método de preservação demonstrou-se eficaz em diminuir o dano da lesão de reperfusão em vários modelos animais. (110-113) (114). Entretanto, o uso de NO na reperfusão pulmonar não diminuiu o edema pulmonar em um ensaio clínico randomizado (115). Em outro estudo com 84 pacientes submetidos a transplante pulmonar, o uso do NO na reperfusão não mostrou benefício em relação à hemodinâmica, extubação, incidência de lesão isquemia-reperfusão e tempo de internação hospitalar e UTI (116). Já Ardehali e colaboradores, demonstraram que o uso do NO inalatório no pós-operatório apresentou benefício em um subgrupo de pacientes que desenvolveram lesão de isquemia-reperfusão, apesar de não diminuir sua incidência. (117).

2.14 Perfluorocarbonos

As primeiras descrições sobre líquidos instilados nas vias aéreas de mamíferos para o estudo da respiração datam do início do século 20. O objetivo do trabalho era investigar a fisiologia pulmonar a partir da introdução desses líquidos no interior dos pulmões.

Devido ao desenvolvimento tecnológico, foram criadas diferentes soluções, preparadas com os mais diversos tipos de substâncias, com a finalidade de melhorar a troca gasosa. Embora essas soluções tenham-se apresentado como uma esperança, o sonho ainda estava longe de ser concretizado.

Os indícios de sucesso surgiram em 1962, quando o fisiologista Johannes A. Kylstra, nascido na Indonésia, filho de pais holandeses, demonstrou, na Universidade de Buffalo, Estados Unidos, que ratos cujos pulmões tinham sido preenchidos por um tipo de solução salina oxigenada podiam ter uma sobrevida de até 18 horas quando submersos em altas pressões, semelhantes às das regiões fundas dos oceanos. Na mesma década, o fisiologista e bioquímico norteamericano Leland C. Clark Jr. e o bioquímico tcheco naturalizado norteamericano Frank Gollan, testaram um novo líquido, denominado perfluorocarbono (PFC), que havia sido desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial no âmbito do Projeto Manhattan.

No artigo que publicaram em 1966 na revista Science, Clark e Gollan sustentavam que aquele líquido era um excelente meio de transporte para o oxigênio e o gás carbônico. Quando os pulmões de ratos e gatos eram inundados por esses gases, eles observavam que os animais podiam respirar em meio líquido por um período de até 20 horas, voltando em seguida a respirar com sucesso o ar ambiente (118).

Os perfluorocarbonos são líquidos incolores, densos e não tóxicos. Têm alta estabilidade química e física. Possuem baixa tensão superficial e são até duas vezes mais densos que a água. Dependendo da complexidade das moléculas dos PFCs, suas densidades podem variar entre 1,75 e 2g/ml.

Quanto à solubilidade, são geralmente pobres solventes e essencialmente insolúveis em água e álcoois (119). Gases tais como hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, dióxido de carbono e gases inertes são altamente solúveis em PFC (120, 121). A difusibilidade do oxigênio e dióxido de carbono nos PFCs é baixa quando comparada com a do nitrogênio

atmosférico; há maior solubilidade e difusibilidade do CO₂ em até cinco vezes quando comparado com o O₂ (122). Existem mais de 50 tipos de PFC produzidos atualmente, com mínimas variações entre suas propriedades e composição química, sendo muitos destes utilizados em estudos experimentais e clínicos (FX-80, FC-75, FC-77, caroxitina D, caroxitina F, RM-101, perfluorobromo, perfluorodecalina, etc.) (123-125). Os perfluorocarbonos apresentam baixa tensão superficial, não interferem nas propriedades dos surfactantes (126), além de exercerem papel protetor para os surfactantes e a membrana de revestimento alveolar (127). Ademais, agem também como carreadores de resíduos localizados dentro do alvéolo (7). Outras aplicações tanto clínicas como experimentais incluem o uso de PFC como meio de contraste em exames radiológicos (10), como expansores plasmáticos (11) tratamento de pneumonias pela administração direta de antibióticos (12), administração direta de substâncias vasoativas em modelos de lesão pulmonar (13), entre outras.

A utilização de perfluorocarbono na preservação de órgãos sólidos tem sido estudada como alternativa para oferta de oxigênio durante a fase de preservação, sendo de forma isolada ou como substância coadjuvante na preservação destes órgãos, entretanto a sua real utilidade necessita ser definida (128).

3. Justificativa

O transplante pulmonar pode aportar grandes benefícios a indivíduos acometidos por uma variedade de doenças pulmonares, que de outro modo, seriam incuráveis. Entretanto, a reduzida oferta de doadores permanece como o principal obstáculo para ao desenvolvimento de programas de transplante pulmonar no Brasil. Fato este que, somado ao curto período de preservação do órgão acaba por diminuir ainda mais a quantidade de enxertos viáveis para a realização de transplantes nos centros especializados.

Os avanços nas técnicas de preservação pulmonar objetivam o aumento no tempo de preservação pulmonar, aumentando a viabilidade do enxerto. Viabilidade esta responsável pelo desempenho do órgão pós-transplante, evitando que ocorra uma disfunção precoce do enxerto assim como o seu resultado funcional a longo prazo. A injúria pulmonar de isquemia-reperfusão apresenta-se como fator complicante, necessitando de constantes aprimoramentos nas técnicas de preservação pulmonar. O método de uso clínico corrente para a preservação pulmonar é a administração de soluções na circulação pulmonar durante a extração do enxerto. Da mesma forma, métodos de ventilação tem sido estudados a fim de melhorar a oxigenação e minimizar os efeitos deletérios no parênquima pulmonar. Uma destas modalidades seria a ventilação líquida parcial, que faz uso de perfluorocarbonos diretamente na via aérea. Os perfluorocarbonos tem demonstrado efeitos benéficos em lesão pulmonar aguda, porém, objetivamos avaliar seu efeito potencializados associado ao método de preservação pulmonar (Perfadex[®]) na preservação de enxertos pulmonares e ainda avaliar seu efeito protetor na injúria de isquemia reperfusão. A comprovação de tal efeito beneficiaria o transplante pulmonar,

visto que um aumento no tempo isquêmico, com uma técnica de baixo custo traz benefícios direto a prática clinica.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Testar a aplicabilidade do perfluorocarbono endobrônquico como substância protetora pulmonar em diferentes fases do transplante pulmonar..

4.2 Objetivos específicos

Avaliar a possibilidade do uso e os efeitos do PFC sobre pulmões que foram submetidos a modelo de isquemia e reperfusão pulmonar

Avaliar a dose ideal de perfluorocarbono para a preservação de enxertos pulmonares submetidos a diferentes tempos de isquemia fria.

Verificar se a utilização do perfluorocarbono em períodos de isquemia prolongados mantém a viabilidade e funcionalidade do enxerto pulmonar pós-transplante

5. Referências Bibliográficas

1. Egan TM, Lambert CJ, Jr., Reddick R, Ulicny KS, Jr., Keagy BA, Wilcox BR. A strategy to increase the donor pool: use of cadaver lungs for transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1991 Nov;52(5):1113-20; discussion 20-1.
2. Ulicny KS, Jr., Egan TM, Lambert CJ, Jr., Reddick RL, Wilcox BR. Cadaver lung donors: effect of preharvest ventilation on graft function. *Ann Thorac Surg.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1993 May;55(5):1185-91.
3. Parquin F, Cerrina J, Le Roy Ladurie F, Brenot F, Herve P, Macchiarini P, et al. Comparison of hemodynamic outcome of patients with pulmonary hypertension after double-lung or heart-lung transplantation. *Transplant Proc.* [Comparative Study]. 1993 Feb;25(1 Pt 2):1157-8.
4. Adoumie R, Serrick C, Giaid A, Shennib H. Early cellular events in the lung allograft. *Ann Thorac Surg.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1992 Dec;54(6):1071-6; discussion 6-7.
5. Loehe F, Mueller C, Bittmann I, Messmer K, Schildberg FW. Influence of long-term preservation with endobronchially administered perflorodecalin on pulmonary graft function. *Transplantation.* 2000 Nov 27;70(10):1417-24.
6. Baba A, Kim YK, Zhang H, Liu M, Slutsky AS. Perfluorocarbon blocks tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 release from alveolar epithelial cells in vitro. *Crit Care Med.* [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2000 Apr;28(4):1113-8.
7. Calderwood HW, Modell JH, Ruiz BC, Brogdon JE, Hood CI. Pulmonary lavage with liquid fluorocarbon in a model of pulmonary edema. *Anesthesiology.* 1973 Feb;38(2):141-4.
8. Hirschl RB, Parent A, Tooley R, McCracken M, Johnson K, Shaffer TH, et al. Liquid ventilation improves pulmonary function, gas exchange, and lung injury in a model of respiratory failure. *Ann Surg.* 1995 Jan;221(1):79-88.
9. Leach CL, Holm B, Morin FC, 3rd, Fuhrman BP, Papo MC, Steinhorn D, et al. Partial liquid ventilation in premature lambs with respiratory distress syndrome: efficacy and compatibility with exogenous surfactant. *J Pediatr.* 1995 Mar;126(3):412-20.

10. Thomas SR, Gradon L, Pratsinis SE, Pratt RG, Fotou GP, McGoron AJ, et al. Perfluorocarbon compound aerosols for delivery to the lung as potential 19F magnetic resonance reporters of regional pulmonary pO₂. *Invest Radiol*. 1997 Jan;32(1):29-38.
11. Waschke KF, Frietsch T. Modified haemoglobins and perfluorocarbons. *Curr Opin Anaesthesiol*. 1999 Apr;12(2):195-202.
12. Fox WW, Weis CM, Cox C, Farina C, Drott H, Wolfson MR, et al. Pulmonary administration of gentamicin during liquid ventilation in a newborn lamb lung injury model. *Pediatrics*. 1997 Nov;100(5):E5.
13. Wolfson MR, Greenspan JS, Shaffer TH. Pulmonary administration of vasoactive substances by perfluorochemical ventilation. *Pediatrics*. 1996 Apr;97(4):449-55.
14. Fuhrman BP, Paczan PR, DeFrancis M. Perfluorocarbon-associated gas exchange. *Crit Care Med*. 1991 May;19(5):712-22.
15. Itano H, Aoe M, Ichiba S, Yamashita M, Date H, Andou A, et al. Partial liquid ventilation for acute allograft dysfunction after canine lung transplantation. *Ann Thorac Surg*. 1999 Feb;67(2):332-9.
16. Andrade CF, Martins LK, Tonietto TA, Koefender C, Anflor LC, Jr., da Silva NB, et al. Partial liquid ventilation with perfluorodecalin following unilateral canine lung allotransplantation in non-heart-beating donors. *J Heart Lung Transplant*. 2004 Feb;23(2):242-51.
17. Keshavjee SH, Yamazaki F, Cardoso PF, McRitchie DI, Patterson GA, Cooper JD. A method for safe twelve-hour pulmonary preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1989 Oct;98(4):529-34.
18. Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM, Cardella JA, Cutz E, Edwards V, et al. Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation. *Ann Surg*. 2000 Mar;231(3):424-31.
19. Yamane M, Liu M, Kaneda H, Uhlig S, Waddell TK, Keshavjee S. Reperfusion-induced gene expression profiles in rat lung transplantation. *Am J Transplant*. 2005 Sep;5(9):2160-9.
20. Quadri SM, Segall L, de Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, et al. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transplant*. 2005 Feb;5(2):292-9.

21. Ishiyama T, Dharmarajan S, Hayama M, Moriya H, Grapperhaus K, Patterson GA. Inhibition of nuclear factor kappaB by IkappaB superrepressor gene transfer ameliorates ischemia-reperfusion injury after experimental lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Jul;130(1):194-201.
22. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Jr., Walker GR, Jr. Lung Homotransplantation in Man. *Jama.* 1963 Dec 21;186:1065-74.
23. Derom F, Barbier F, Ringoir S, Versieck J, Rolly G, Berzsenyi G, et al. Ten-month survival after lung homotransplantation in man. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1971 Jun;61(6):835-46.
24. Nelems JM, Rebuck AS, Cooper JD, Goldberg M, Halloran PF, Vellend H. Human lung transplantation. *Chest.* 1980 Oct;78(4):569-73.
25. Sequential bilateral lung transplantation for paraquat poisoning. A case report. The Toronto Lung Transplant group. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985 May;89(5):734-42.
26. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. Toronto Lung Transplant Group. *N Engl J Med.* 1986 May 1;314(18):1140-5.
27. Bartlett A, Rela M. Progress in surgical techniques in pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 2010 Feb;14(1):33-40.
28. Mohamed El Moghazy W, Ogura Y, Mutsuko M, Harada K, Koizumi A, Uemoto S. Pediatric living-donor liver transplantation for acute liver failure: analysis of 57 cases. *Transpl Int.* 2010 Aug;23(8):823-30.
29. Solomon M, Grasemann H, Keshavjee S. Pediatric lung transplantation. *Pediatr Clin North Am.* 2010 Apr;57(2):375-91, table of contents.
30. Mueller C, Hansen G, Ballmann M, Schwerk N, Simon AR, Goerler H, et al. Size reduction of donor organs in pediatric lung transplantation. *Pediatr Transplant.* 2010 May;14(3):364-8.
31. Sweet SC. Pediatric living donor lobar lung transplantation. *Pediatr Transplant.* 2006 Nov;10(7):861-8.
32. Fieux F, Losser MR, Bourgeois E, Bonnet F, Marie O, Gaudez F, et al. Kidney retrieval after sudden out of hospital refractory cardiac arrest: a cohort of uncontrolled non heart beating donors. *Crit Care.* 2009;13(4):R141.
33. Mateos-Rodriguez A, Pardillos-Ferrer L, Navalpotro-Pascual JM, Barba-Alonso C, Martin-Maldonado ME, Andres-Belmonte A. Kidney transplant

function using organs from non-heart-beating donors maintained by mechanical chest compressions. *Resuscitation*. 2010 Jul;81(7):904-7.

34. Jimenez-Galanes S, Meneu-Diaz MJ, Elola-Olaso AM, Perez-Saborido B, Yiliam FS, Calvo AG, et al. Liver transplantation using uncontrolled non-heart-beating donors under normothermic extracorporeal membrane oxygenation. *Liver Transpl*. 2009 Sep;15(9):1110-8.

35. Gozzini S, Perera MT, Mayer DA, Mirza DF, Kelly DA, Muiesan P, et al. Liver transplantation in children using non-heart-beating donors (NHBD). *Pediatr Transplant*. 2010 Jun;14(4):554-7.

36. Oto T. Lung transplantation from donation after cardiac death (non-heart-beating) donors. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2008 Nov;56(11):533-8.

37. Mason DP, Thuita L, Alster JM, Murthy SC, Budev MM, Mehta AC, et al. Should lung transplantation be performed using donation after cardiac death? The United States experience. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008 Oct;136(4):1061-6.

38. De Oliveira NC, Osaki S, Maloney JD, Meyer KC, Kohmoto T, D'Alessandro AM, et al. Lung transplantation with donation after cardiac death donors: long-term follow-up in a single center. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010 May;139(5):1306-15.

39. Transplantes de Pulmão por Estado [database on the Internet]. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. 2010 [cited 05/06/2010]. Available from:

<http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/profissionais/rbt/mensagemRestrita.aspx?idCategoria=2>.

40. Órgãos ABdTd. Cuidados Básicos na Manutenção do Doador. São paulo: Associação Brasileira de Transplante de Órgãos; 2010 [cited 2010 05/06/2010]; Available from:

<http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/profissionais/doacao/doacao.aspx>.

41. Blades B, Beattie EJ, Jr., Hill RP, Thistlethwaite R. Ischemia of the lung. *Ann Surg*. 1952 Jul;136(1):56-62.

42. Blades B, Pierpont HC, Samadi A, Hill RP. The effect of experimental lung ischemia on pulmonary function; a preliminary report. *Surg Forum*. 1953 Oct;4:255-60.

43. Homatas J, Bryant L, Eiseman B. Time limits of cadaver lung viability. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1968 Jul;56(1):132-40.
44. Veith FJ, Sinha SB, Graves JS, Boley SJ, Dougherty JC. Ischemic tolerance of the lung. The effect of ventilation and inflation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1971 May;61(5):804-10.
45. Bigelow WG, Callaghan JC, Hopps JA. General hypothermia for experimental intracardiac surgery; the use of electrophrenic respirations, an artificial pacemaker for cardiac standstill, and radio-frequency rewarming in general hypothermia. *Trans Meet Am Surg Assoc Am Surg Assoc.* 1950;68:211-9.
46. Harjula A, Baldwin JC, Shumway NE. Donor deep hypothermia or donor pretreatment with prostaglandin E1 and single pulmonary artery flush for heart-lung graft preservation: an experimental primate study. *Ann Thorac Surg.* 1988 Nov;46(5):553-5.
47. White JJ, Tanser PH, Anthonisen NR, Wynands JE, Pare JA, Becklake MR, et al. Human lung homotransplantation. *Can Med Assoc J.* 1966 Jun 4;94(23):1199-209.
48. Cohen RG, Starnes VA. Living donor lung transplantation. *World J Surg.* 2001 Feb;25(2):244-50.
49. Yamane M, Date H, Okazaki M, Toyooka S, Aoe M, Sano Y. Long-term improvement in pulmonary function after living donor lobar lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2007 Jul;26(7):687-92.
50. Steen S, Sjoberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet.* 2001 Mar 17;357(9259):825-9.
51. de Antonio DG, Marcos R, Laporta R, Mora G, Garcia-Gallo C, Gamez P, et al. Results of clinical lung transplant from uncontrolled non-heart-beating donors. *J Heart Lung Transplant.* 2007 May;26(5):529-34.
52. Botha P, Fisher AJ, Dark JH. Marginal lung donors: A diminishing margin of safety? *Transplantation.* 2006 Nov 27;82(10):1273-9.
53. Kawut SM, Reyentovich A, Wilt JS, Anzeck R, Lederer DJ, O'Shea MK, et al. Outcomes of extended donor lung recipients after lung transplantation. *Transplantation.* 2005 Feb 15;79(3):310-6.

54. Botha P, Trivedi D, Weir CJ, Searl CP, Corris PA, Dark JH, et al. Extended donor criteria in lung transplantation: impact on organ allocation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006 May;131(5):1154-60.
55. Pierre AF, Sekine Y, Hutcheon MA, Waddell TK, Keshavjee SH. Marginal donor lungs: a reassessment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Mar;123(3):421-7; discussion, 7-8.
56. Kaneda H, Waddell TK, de Perrot M, Bai XH, Gutierrez C, Arenovich T, et al. Pre-implantation multiple cytokine mRNA expression analysis of donor lung grafts predicts survival after lung transplantation in humans. *Am J Transplant.* 2006 Mar;6(3):544-51.
57. Ware LB, Wang Y, Fang X, Warnock M, Sakuma T, Hall TS, et al. Assessment of lungs rejected for transplantation and implications for donor selection. *Lancet.* 2002 Aug 24;360(9333):619-20.
58. Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, et al. Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med.* 2011 Apr 14;364(15):1431-40.
59. Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet.* 1969 Dec 6;2(7632):1219-22.
60. Starkey TD, Sakakibara N, Hagberg RC, Tazelaar HD, Baldwin JC, Jamieson SW. Successful six-hour cardiopulmonary preservation with simple hypothermic crystalloid flush. *J Heart Transplant.* 1986 Jul-Aug;5(4):291-7.
61. Harjula A, Baldwin JC, Tazelaar HD, Jamieson SW, Reitz BA, Shumway NE. Minimal lung pathology in long-term primate survivors of heart-lung transplantation. *Transplantation.* 1987 Dec;44(6):852-4.
62. Locke TJ, Hooper TL, Flecknell PA, McGregor CG. Preservation of the lung. Comparison of topical cooling and cold crystalloid pulmonary perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988 Nov;96(5):789-95.
63. Lakshminarayan S, Kowalski TF, Kirk W, Butler J. The effect of bronchial venous pressure on pulmonary edema in the dog. *Respir Physiol.* 1990 Dec;82(3):317-24.
64. Wahlberg JA, Southard JH, Belzer FO. Development of a cold storage solution for pancreas preservation. *Cryobiology.* 1986 Dec;23(6):477-82.

65. Semik M, Moller F, Lange V, Bernhard A, Toomes H. Comparison of Euro-Collins and UW-1 solutions for lung preservation using the parabiotic rat perfusion model. *Transplant Proc.* 1990 Oct;22(5):2235-6.
66. Bresticker MA, LoCicero J, 3rd, Oba J, Greene R. Successful extended lung preservation with UW solution. *Transplantation.* 1992 Nov;54(5):780-4.
67. Fujimura S, Kondo T, Nakada T. [Lung transplant--problems and recent trends]. *Nihon Rinsho.* 1985 Jan;43(1):83-6.
68. Handa M, Fujimura S, Kondo T, Nakada T. [Preservation for lung transplantation]. *Kyobu Geka.* 1987 Feb;40(3):174-9.
69. Yokomise H, Ueno T, Yamazaki F, Keshavjee S, Slutsky A, Patterson G. The effect and optimal time of administration of verapamil on lung preservation. *Transplantation.* 1990 Jun;49(6):1039-43.
70. Eisenberg S. The effect of low molecular weight dextran on the viscosity and suspension characteristics of blood. *Am J Med Sci.* 1969 May;257(5):336-43.
71. Reigner B, Reveilleau P, Gayral M, Papon X, Enon B, Chevalier JM. Eversion endarterectomy of the internal carotid artery: midterm results of a new technique. *Ann Vasc Surg.* 1995 May;9(3):241-6.
72. Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, Sakamaki Y, Starnes VA, Barr ML. A comparison of the new preservation solution Celsior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury. *Transplantation.* 1999 Jan 15;67(1):152-5.
73. Wittwer T, Wahlers T, Fehrenbach A, Elki S, Haverich A. Improvement of pulmonary preservation with Celsior and Perfadex: impact of storage time on early post-ischemic lung function. *J Heart Lung Transplant.* 1999 Dec;18(12):1198-201.
74. Christie JD, Kotloff RM, Pochettino A, Arcasoy SM, Rosengard BR, Landis JR, et al. Clinical risk factors for primary graft failure following lung transplantation. *Chest.* 2003 Oct;124(4):1232-41.
75. Zaas D, Palmer SM. Respiratory failure early after lung transplantation: now that we know the extent of the problem, what are the solutions? *Chest.* 2003 Jan;123(1):14-6.

76. King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, et al. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2000 Jun;69(6):1681-5.
77. Christie JD, Van Raemdonck D, de Perrot M, Barr M, Keshavjee S, Arcasoy S, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part I: introduction and methods. *J Heart Lung Transplant.* 2005 Oct;24(10):1451-3.
78. Christie JD, Sager JS, Kimmel SE, Ahya VN, Gaughan C, Blumenthal NP, et al. Impact of primary graft failure on outcomes following lung transplantation. *Chest.* 2005 Jan;127(1):161-5.
79. de Perrot M, Bonser RS, Dark J, Kelly RF, McGiffin D, Menza R, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part III: donor-related risk factors and markers. *J Heart Lung Transplant.* 2005 Oct;24(10):1460-7.
80. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Feb 15;167(4):490-511.
81. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science.* 1954 May 7;119(3097):623-6.
82. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985 Jan 17;312(3):159-63.
83. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.* 1988 Apr;63(4):381-9.
84. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil.* 1997;43(1):61-8.
85. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology.* 1981 Jul;81(1):22-9.
86. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95.
87. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:67-101.

88. McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982 Nov;60(11):1346-52.
89. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci.* 1994 Apr;307(4):284-92.
90. Pinheiro BV, Holanda MA, Araujo FG, Romaldini H. Lesão pulmonar de reperfusão. *J Pneumol.* 1999;25(2):124-36.
91. van der Kraaij AM, Mostert LJ, van Eijk HG, Koster JF. Iron-load increases the susceptibility of rat hearts to oxygen reperfusion damage. Protection by the antioxidant (+)-cyanidanol-3 and deferoxamine. *Circulation.* 1988 Aug;78(2):442-9.
92. Minotti G, Aust SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1987 Jan 25;262(3):1098-104.
93. Novick RJ, Gehman KE, Ali IS, Lee J. Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *Ann Thorac Surg.* 1996 Jul;62(1):302-14.
94. Mayer E, Puskas JD, Cardoso PF, Shi S, Slutsky AS, Patterson GA. Reliable eighteen-hour lung preservation at 4 degrees and 10 degrees C by pulmonary artery flush after high-dose prostaglandin E1 administration. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Jun;103(6):1136-42.
95. Date H, Matsumura A, Manchester JK, Obo H, Lima O, Cooper JM, et al. Evaluation of lung metabolism during successful twenty-four-hour canine lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Mar;105(3):480-91.
96. Eckenhoff RG, Dodia C, Tan Z, Fisher AB. Oxygen-dependent reperfusion injury in the isolated rat lung. *J Appl Physiol.* 1992 Apr;72(4):1454-60.
97. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med.* 2003 Aug 1;35(3):236-56.
98. Demiryurek AT, Wadsworth RM. Superoxide in the pulmonary circulation. *Pharmacol Ther.* 1999 Dec;84(3):355-65.
99. Puskas JD, Hirai T, Christie N, Mayer E, Slutsky AS, Patterson GA. Reliable thirty-hour lung preservation by donor lung hyperinflation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Oct;104(4):1075-83.

100. Chatterjee S, Fisher AB. ROS to the rescue. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Oct;287(4):L704-5.
101. Takeyoshi I, Iwanami K, Kamoshita N, Takahashi T, Kobayashi J, Tomizawa N, et al. Effect of lazaroid U-74389G on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs. *J Invest Surg*. 2001 Mar-Apr;14(2):83-92.
102. Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S, Vogt P, Odermatt B, Weder W, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2000 May;69(5):1532-6.
103. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica*. 2003 Feb;88(2):212-8.
104. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000 Dec;64(4):821-46.
105. Kuwano K, Hara N. Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Feb;22(2):147-9.
106. Hart CM. Nitric oxide in adult lung disease. *Chest*. 1999 May;115(5):1407-17.
107. Liu M, Tremblay L, Cassivi SD, Bai XH, Mourgeon E, Pierre AF, et al. Alterations of nitric oxide synthase expression and activity during rat lung transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 May;278(5):L1071-81.
108. Mehta S. The effects of nitric oxide in acute lung injury. *Vascul Pharmacol*. 2005 Dec;43(6):390-403.
109. Le Cras TD, McMurtry IF. Nitric oxide production in the hypoxic lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Apr;280(4):L575-82.
110. Yamagishi H, Yamashita C, Okada M. Preventive influence of inhaled nitric oxide on lung ischemia-reperfusion injury. *Surg Today*. 1999;29(9):897-901.
111. Ovechkin AV, Lominadze D, Sedoris KC, Gozal E, Robinson TW, Roberts AM. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates platelet adhesion in subpleural arterioles caused by lung ischemia-reperfusion in rabbits. *J Appl Physiol*. 2005 Dec;99(6):2423-32.
112. Esme H, Fidan H, Solak O, Dilek FH, Demirel R, Unlu M. Beneficial effects of supplemental nitric oxide donor given during reperfusion period in

reperfusion-induced lung injury. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2006 Oct;54(7):477-83.

113. Yamashita H, Akamine S, Sumida Y, Inoue M, Sawada T, Nagayasu T, et al. Inhaled nitric oxide attenuates apoptosis in ischemia-reperfusion injury of the rabbit lung. *Ann Thorac Surg.* 2004 Jul;78(1):292-7.

114. Waldow T, Alexiou K, Witt W, Wagner FM, Kappert U, Knaut M, et al. Protection of lung tissue against ischemia/reperfusion injury by preconditioning with inhaled nitric oxide in an in situ pig model of normothermic pulmonary ischemia. *Nitric Oxide.* 2004 Jun;10(4):195-201.

115. Perrin G, Roch A, Michelet P, Reynaud-Gaubert M, Thomas P, Doddoli C, et al. Inhaled nitric oxide does not prevent pulmonary edema after lung transplantation measured by lung water content: a randomized clinical study. *Chest.* [Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Apr;129(4):1024-30.

116. Meade MO, Granton JT, Matte-Martyn A, McRae K, Weaver B, Cripps P, et al. A randomized trial of inhaled nitric oxide to prevent ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Jun 1;167(11):1483-9.

117. Ardehali A, Laks H, Levine M, Shpiner R, Ross D, Watson LD, et al. A prospective trial of inhaled nitric oxide in clinical lung transplantation. *Transplantation.* 2001 Jul 15;72(1):112-5.

118. Clark LC, Jr., Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science.* 1966 Jun 24;152(730):1755-6.

119. Sargent JW, Seffl RJ. Properties of perfluorinated liquids. *Fed Proc.* 1970 Sep-Oct;29(5):1699-703.

120. Peterson RE. Measurement of the solubility of gases in oils. *Fed Proc.* 1970 Sep-Oct;29(5):1714-6.

121. Osburn JO. A method for estimating the solubility of gases in liquids. *Fed Proc.* 1970 Sep-Oct;29(5):1704-7.

122. Gollan F, McDermott J, Johnson AE, Namon R. Compliance and diffusion during respiration with fluorocarbon fluid. *Fed Proc.* 1970 Sep-Oct;29(5):1725-30.

123. Patel MM, Szanto P, Yates B, Long DM. Survival and histopathologic changes in lungs of hamsters following synthetic liquid breathing. *Fed Proc.* 1970 Sep-Oct;29(5):1740-5.
124. Tuazon JG, Modell JH, Hood CI, Swenson EW. Pulmonary function after ventilation with fluorocarbon liquid (Caroxin-D). *Anesthesiology.* 1973 Feb;38(2):134-40.
125. Saga S, Modell JH, Calderwood HW, Lucas AJ, Tham MK, Swenson EW. Pulmonary function after ventilation with fluorocarbon liquid P-12F (caroxin-F). *J Appl Physiol.* 1973 Feb;34(2):160-4.
126. Modell JH, Gollan F, Giammona ST, Parker D. Effect of fluorocarbon liquid on surface tension properties of pulmonary surfactant. *Chest.* 1970 Mar;57(3):263-5.
127. Kylstra JA, Schoenfisch WH. Alveolar surface tension in fluorocarbon-filled lungs. *J Appl Physiol.* 1972 Jul;33(1):32-5.
128. Hosgood SA, Nicholson ML. The role of perfluorocarbon in organ preservation. *Transplantation.* 2010 May 27;89(10):1169-75.

6. Artigo I

When is the injury potentially reversible in a lung Ischemia-reperfusion model?

Objective - To verify in an experimental model of lung ischemia-reperfusion (IR) injury the impact of ischemic time on lung cells viability based on the presence of apoptotic and necrotic cells and its repercussion on lung performance after reperfusion.

Methods - Twenty-four animals were subjected to a selective clamping of the left pulmonary artery and divided in four groups (n = 6) according to ischemic time: 15 min (IR15), 30min (IR30), 45min (IR45) and 60 min (IR60). After reperfusion the animals were observed for 120 minutes. Hemodynamics, arterial blood gases measurements and histological changes were analysed. Immunofluorescence for caspase 3 and Annexin V were performed. Lipid peroxidation was assessed by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and caspase-3 by colorimetric extract. Results - No significant differences were observed in lipid peroxidation, blood gas analyses and hemodynamics in the different groups. We observed a significant increase in apoptotic activity in IR45 group when compared to the others ischemic times ($p < 0.05$). However, in IR60 group there was a significant increase in number of necrotic cells assessed by Annexin V. Histological score did not show differences among the different groups.

Conclusion - Using this model, periods longer than 45 minutes of ischemia result in an increased number of necrotic cells that may not revert the effects of the IR injury due to the lack of viable cells.

Introduction

Lung transplantation has become an established therapeutic option for end-stage pulmonary disease. However, early graft dysfunction remains a life-threatening complication, which may be influenced by an ineffective lung protection and direct cell damage mainly originated from the so-called ischemia-reperfusion (IR) injury (1). Lung ischemia-reperfusion injury is also observed after cardiopulmonary bypass during cardiac surgery, which may lead to physiological changes such as an increase in microvascular permeability, edema formation and impaired gas exchange. These alterations may be a result of activation of inflammatory mediators such as chemokines, cytokines and oxygen free radicals (2).

In the literature, several different animal models have been used aiming prevention of IR as well as improvement of lung protection (3-5). This wide variability on animal models of lung ischemia-reperfusion sometimes makes difficult their reproducibility and reliability. The animal models presented in the literature differ in species, method of hilar clamping, and especially in time of lung ischemia, which may vary from 15 to 400 minutes (6-9). The ischemic time disparity may be one of the factors responsible for a differentiated cell response, which may influence the outcome of particular studies (6-9).

We believe that the variability of results in IR animal models may be an effect of cell viability which would directly be related to the lung ischemic time. Therefore, an adequate knowledge of cellular response in different periods of ischemia would provide important information regarding the best suitable time for the use of new potential drugs for the treatment of the hazardous effects of

the lung IR injury. Thus, we studied a very well-known animal model of IR injury using different ischemic times focusing on apoptosis in order to verify which time point would present the most severe and potentially reversible ischemic damage.

Material and Methods

Experimental Design

Twenty-four Wistar male rats (250–300 g) were randomized in 4 groups ($n = 6$) according to time of left pulmonary artery clamping: 15 (IR 15), 30 (IR 30), 45 (IR 45) or 60 minutes (IR 60) followed by 90 min of reperfusion.

Animals were handled in accordance with the Animal Welfare Act and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication, revised 1996). The Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved the experimental protocols.

Surgical Procedure

The animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) via intraperitoneal injections. The rats were tracheostomized, intubated and mechanically ventilated at room air (Harvard Rodent Ventilator, model 683; Harvard Apparatus Co. Millis, MA, USA) using a tidal volume of 10 mL/kg of body weight, a respiratory rate of 70-80 breaths/min and a positive end expiratory pressure (PEEP) of 2 cmH₂O. Mean systemic arterial pressure (MAP) was measured through cannulation of the right carotid artery (Sirecust 730; Siemens, Solna, Sweden), which was also used for collecting samples for

arterial blood gas analysis (Blood Gas Analyzer, Siemens Bayer 865, Siemens, Solna, Sweden). A left thoracotomy was performed in the fifth intercostal space, the pulmonary ligament was sectioned, and subsequently, the left pulmonary artery was isolated for selective clamping using a vascular microclip (Vicca Neuroclip, Cachoeirinha, RS, Brazil). Immediately before clamping, lung expansion was achieved through occlusion of the expiratory valve for three inspiratory cycles in order to avoid atelectasis. During the clamping period, both lungs were maintained on mechanical ventilation using the settings described above. Mean systemic arterial pressure and arterial blood gases were measured prior thoracotomy (basal) and at the end of the experiment. After the 90-min reperfusion period, the animals were anestesiased and sacrificed.

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)

The tissue samples were placed in assay tubes, to which were added 0.75 mL of 10% trichloroacetic acid, 0.25 mL of the homogenate, 0.5 mL of 0.67% thiobarbituric acid and 25 mL of distilled water. Each tube was agitated and heated to 100°C, after they were cooled in ice and 1.5 mL of n-butyl alcohol were added. Subsequently, each tube was agitated in the Vortex (Biomatic, Porto Alegre, RS, Brasil), agitated for 45s and centrifuged for 10 min at 3,000 rpm ($1,110 \times g$). Finally, the stained product was removed and read in a spectrophotometer (CARY 3E UV-Visible Spectrophotometer; Varian, Palo Alto, CA, USA) at a wavelength of 535 nm. The concentration of TBARS obtained was expressed as nmol/mg of protein (10).

Caspase-3 activity assay

Frozen lung tissues were washed twice with cold PBS and homogenized by adding cold lysis buffer containing 25 mM HEPES, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 25 mM NaF, 1 mM Sodium Orthovanadate and protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). The extract was transferred to a microfuge tube and centrifuged for 10 min at 15,000 g. The supernatants were collected and stored at -20° C. The homogenates were incubated for 60 min at 37°C in a buffer 20 mM HEPES, Glycerol 10%, DTT 2 mM, pH = 7.5 containing 100 µl of specific colorimetric substrates 7-amino-4-methylcoumarin N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valil-L-aspartic acid amide (Ac-DEV-AMC) for caspase-3, (Alexis Biochemicals, Cornerstone, San Diego, CA, USA). Cleavage of the colorimetric caspase-3 substrate were monitored using colorimetric Microplate reader (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at emission wavelengths of 460 nm. Activity was expressed as colorimetric units per milligram of protein per min of incubation.

Caspase-3 Immunofluorescence

Active caspase-3 was performed utilizing an EnVision visualization system (Dako). Briefly, immunolocalization was performed on paraffin-embedded, formalin-fixed rat lungs. After paraffin removal in xylene, the sections were rehydrated and submitted to heat-steam treatment for 30 min in a 10 mM citric acid monohydrate solution. The endogenous peroxidase activity was quenched by incubating the specimen for 5 min with Peroxidase Block. The specimens were then incubated with anti-active caspase-3 rabbit primary antibody (Abcam) overnight at 4°C followed by incubation with the labeled

polymer for 30 min. Staining was completed by incubation with 3,3'-diaminobenzidine (DAB+) substrate-chromogen, which results in a brown-colored precipitate at the antigen site. Measurements of active caspase-3-positive cells were performed on 10–15 images/slide captured by an independent blinded observer and normalized to total cell count by DAPI staining.

Apoptosis and Necrosis Quantification

Apoptosis and Necrosis Quantification Kit (Biotium Inc, Hayward, USA) provides a convenient assay for quantifying apoptotic (green) and necrotic (red) cells within the same cell population by fluorescence microscopy. The analysis was obtained using a Binding Buffer 1:5 in distilled water. After washing cells twice with 1X Binding Buffer, it was added 5 μ L of Annexin V labeled with fluorescein (FITC) and 5 μ L of Ethidium Homodimer III into 100 μ L binding Buffer to make the staining solution. Following Annexin V staining, cells were fixed with 2% formaldehyde for immunohistochemistry. Each coverslip was stained with staining solution for 15 minutes and washed with Binding Buffer 1-2 times. The cells were observed under a fluorescence microscope using a dual filter set for FITC.

Lung Histology

Lung tissue specimens were fixed in formalin and dehydrated, cleared, and embedded in paraffin. Specimens were cut into 8- μ m serial sections and stained with hematoxylin-eosin. One blinded pathologist to the experimental protocol and the region of sampling performed quantitative analysis by light

microscopy. Each sample was examined under both low and high power fields. At least four sections were obtained from each block, and 20 fields were randomly selected and analyzed for each section. The severity of histological lesions was assessed using a score (HIS) Histological Score (11) based on six parameters: intra-alveolar edema, hyaline membrane formation, hemorrhage, recruitment of granulocytes into the air spaces, focal alveolar collapse or consolidation, and epithelial desquamation/necrosis of airways or alveoli. Each parameter was evaluated semiquantitatively using the following scale: 0 = absent, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = prominent. In addition, the percentage of the involved area of each histological specimen was estimated (0 to 100%) to quantify the histological changes.

Statistical Analysis

The results in text, tables and figures are presented as mean \pm standard deviation (SD). Data was analyzed using SPSS version 16.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). If the overall level of the ANOVA was significant, intergroup comparisons were made by the Tukey *post-hoc* test. In the case of unequal variances or an abnormal distribution, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed, followed by Mann-Whitney U tests for intergroup comparisons. A p value of <0.05 was considered to be significant.

Results

The PaO₂ significantly decreased at the end of the observation period in groups IR30, IR45 and IR60 ($p < 0.05$) when compared to baseline. Final mean arterial pressure was significantly lower to baseline only in group IR60 ($p < 0.05$) (Table 1). There was no significant difference in the quantification of lipid peroxidation products (figure 1).

The activity of caspase 3 was significantly higher ($p < 0.01$) in group IR45 when compared to other IR groups. This finding was confirmed using immunofluorescence for caspase-3 (figures 2 and 4).

To evaluate the relationship among necrotic and apoptotic cells in the same lung tissue, we used Annexin V staining. In the IR30 group we observed few apoptotic cells, however this finding was more prominent in the IR45 group. In IR60 group there was an increase of necrotic cells and reduced number of apoptotic cells (figure 3).

Histopathological analysis of the lung tissues demonstrated a progressive lung injury directly related to the increase of the ischemic times. However, there was no difference between IR45 and IR60 groups. Both groups showed severe changes in lung morphology characterized by cellular infiltrates, thickening of the alveolar septae and atelectasis. When analyzed the severity of the histological injury using the previously described histological score (HIS) there was no statistical difference among all four groups (figure 5).

Discussion

In this study we showed that the ischemic time has a direct effect on lung cell viability in an experimental model of lung ischemia and reperfusion in rats. The increased activity of caspase 3 reflected a higher number of apoptotic cells after 45 minutes of ischemia. On the other hand, the group IR60 had almost no apoptotic activity but an enormous presence of necrotic cells, representing scarcity of viable cells.

Unlike other animal models of lung IR injury where a massive hilar clamping is performed, we chose the left pulmonary artery clamping which allows ventilation of both lungs during all ischemic period. We believe that the model we used is the most suitable for studying this syndrome. In such scenario there is no interference of the pulmonary atelectasis which likely could influence results.

In general, five main variables must be considered in pulmonary IR models: the inflation state of the lung (deflated vs. inflated), the extension of the ischemic lesion (pulmonary, bronchial circulation, venous return), the duration of ischemia and posterior reperfusion, the experimental preparation (in vivo vs. isolated perfused lungs), and the animal species (7). When lung ischemia is followed by reperfusion, inflation of the lung is an important factor (8). Sakuma et al. (11) showed that in rabbits, 4 h of unilateral hilar occlusion with lung deflation followed by 1 h of reperfusion resulted in fulminant pulmonary edema and death. The development of injury in this model was prevented by inflation of

the lungs, either with oxygen or nitrogen. Similar effects have been shown in dogs and rats (12, 13).

In regard to the extension of the ischemic injury, the lungs are perfused by two separate systems, the pulmonary circulation and the bronchial circulation. Occlusion of the pulmonary artery alone results in milder injury than occlusion of both the pulmonary artery and the bronchial circulation (12, 14). Reverse pulmonary venous flow from the left atrium can occur if the hilum is not clamped, leading to less injury when complete occlusion of the hilum is performed (15, 16). The extension of ischemia is also affected by whether oxygenated air continues to ventilate the lungs while the circulation is blocked (17).

The effect of the ischemic time and posterior reperfusion is difficult to be evaluated because of many different protocols, however some comments can be addressed. When ischemic time is variable (45 minutes to 4 hours) and the reperfusion time remains constant, longer ischemic times result in worse lung injury (9, 18). When the ischemic time is kept constant and the reperfusion time is changeable (30 min to 2h), the severity of injury increases with longer reperfusion times (19). Thus, ischemia and reperfusion times independently affect the severity of the subsequent injury.

We found no statistical differences among the groups in terms of lipid peroxidation, as assessed by quantification of TBARS. This result is similar to those described by Pilla et al using a selective clamping of the pulmonary artery and Torres et al by clamping the entire hilum (20). A reasonable explanation for this finding would be that oxidative stress resulting from ischemia may be different from that resulting from hypoxia (21). Hypoxia and the subsequent

anoxia cause a decrease in the amount of intracellular adenosine triphosphate and an increase in its degradation products, such as hypoxanthine, which promotes ROS production when the oxygen is reintroduced (through reperfusion or ventilation).

The induction of apoptosis occurs through activation and induction of two pathways. The intrinsic pathway is dependent on the mitochondria and is activated by reactive oxygen species (ROS), while the extrinsic pathway is dependent on inflammatory molecules such as tumor necrosis factor α (TNF α). However, to activate ROS production via NADPH, a contribution of oxidase-TNF α is necessary to the intrinsic pathway (22). Both pathways promote the activation of caspases, proteases responsible for cleavage of specific cellular substrates resulting in conformation changes in cell membrane alteration, DNA fragmentation and subsequent cell death (23). The intrinsic pathway is activated early in reperfusion, whereas the extrinsic pathway can be activated until several hours after reperfusion (22, 23).

Apoptosis alone may not be responsible for the deterioration of lung function, but apoptosis may lead to necrosis. Apoptosis and necrosis may coexist, and alteration of cell death modes may be an important mechanism responsible for organ damage induced by the IR process (18, 24). In different studies, the deterioration of lung function (arterial partial pressure of O₂, wet/dry lung weight ratio, and peak airway pressure) was correlated only with the degree of necrosis but not with apoptosis (25).

We found that the highest apoptosis expression occurred in the group subjected to 45 minutes of ischemia, which we consider the ideal period to perform the evaluation of ischemia-perfusion in an experimental model by

clamping of the pulmonary artery followed by 90 minutes of reperfusion. At this time point the lung has a normal gas exchange and the cells are still viable.

We believe that periods longer than 45 minutes of ischemia may result in an increased number of necrotic cells that may not revert the effects of the IR injury due to the lack of viable cells. The use of new drugs or substances could improve cell viability during longer ischemic times reducing the deleterious effects of the IR injury.

References

1. Cobelens PM, van Putte BP, Kavelaars A, Heijnen CJ, Kesecioglu J. Inflammatory consequences of lung ischemia-reperfusion injury and low-pressure ventilation. *J Surg Res*. 2009 May 15;153(2):295-301.
2. Van Putte BP, Kesecioglu J, Hendriks JM, Persy VP, van Marck E, Van Schil PE, et al. Cellular infiltrates and injury evaluation in a rat model of warm pulmonary ischemia-reperfusion. *Crit Care*. 2005 Feb;9(1):R1-8.
3. Peng CK, Huang KL, Wu CP, Li MH, Hu YT, Hsu CW, et al. Glutamine protects ischemia-reperfusion induced acute lung injury in isolated rat lungs. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011 Feb;24(1):153-61.
4. Chien S, Zhang F, Niu W, Tseng MT, Gray L, Jr. Comparison of university of wisconsin, euro-collins, low-potassium dextran, and krebs-henseleit solutions for hypothermic lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000 May;119(5):921-30.
5. Bertolotti A, Gomez C, Lascano E, Negroni J, Cuniberti L, Yannarelli G, et al. Effect of preservation solution on graft viability in single-lung transplantation from heart-beating donors in pigs. *Transplant Proc*. 2007 Mar;39(2):355-7.
6. Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, et al. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Nov;162(5):1932-9.
7. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Sep;295(3):L379-99.

8. Torres RL, Martins LK, Picoral M, Auzani J, Fernandes TR, Torres IL, et al. The potential protective effect of low potassium dextran against lipid peroxidation in a rat lung transplantation model. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2009 Aug;57(5):309-11.
9. Wang M, Peng J, Wang R, Zhao L, Xia Z. TRPV1 Agonist Capsaicin Attenuates Lung Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits. *J Surg Res*. 2010 Sep 27.
10. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*. 1978;52:302-10.
11. Fujino Y, Goddon S, Chiche JD, Hromi J, Kacmarek RM. Partial liquid ventilation ventilates better than gas ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Aug;162(2 Pt 1):650-7.
12. Hamvas A, Schuster DP. Bronchial and reverse pulmonary venous blood flow protect the lung from ischemia-reperfusion injury. *J Appl Physiol*. 1994 Aug;77(2):731-6.
13. Waddell TK, Gorczynski RM, DeCampos KN, Patterson GA, Slutsky AS. Major histocompatibility complex expression and lung ischemia-reperfusion in rats. *Ann Thorac Surg*. 1996 Sep;62(3):866-72.
14. Pearse DB, Wagner EM. Role of the bronchial circulation in ischemia-reperfusion lung injury. *J Appl Physiol*. 1994 Jan;76(1):259-65.
15. Deffebach ME, Lakshminarayan S, Kirk W, Butler J. Bronchial circulation and cyclooxygenase products in acute lung injury. *J Appl Physiol*. 1987 Sep;63(3):1083-8.

16. Hamvas A, Park CK, Palazzo R, Liptay M, Cooper J, Schuster DP. Modifying pulmonary ischemia-reperfusion injury by altering ventilatory strategies during ischemia. *J Appl Physiol*. 1992 Nov;73(5):2112-9.
17. Obermiller T, Lakshminarayan S, Willoughby S, Mendenhall J, Butler J. Influence of lung volume and left atrial pressure on reverse pulmonary venous blood flow. *J Appl Physiol*. 1991 Jan;70(1):447-53.
18. Sharma AK, LaPar DJ, Zhao Y, Li L, Lau CL, Kron IL, et al. Natural killer T cell-derived IL-17 mediates lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jun 1;183(11):1539-49.
19. Waldow T, Witt W, Buzin A, Ulmer A, Matschke K. Prevention of ischemia/reperfusion-induced accumulation of matrix metalloproteinases in rat lung by preconditioning with nitric oxide. *J Surg Res*. 2009 Apr;152(2):198-208.
20. Pilla ES, Vendrame GS, Sanchez PG, Grun G, Fontena E, Forgiarini LA, Jr., et al. Ischemic preconditioning by selective occlusion of the pulmonary artery in rats. *J Bras Pneumol*. 2008 Aug;34(8):583-9.
21. Torres RL, Belo-Klein A, Andrade CF, Cardoso PF. Effect of systemically administered low potassium dextran solution on oxidative stress in a rat model of lung ischemia. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2009 Jan;8(1):3-6.
22. Tang PS, Mura M, Seth R, Liu M. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Apr;294(4):L632-41.
23. Chiang CH, Chuang CH, Liu SL. Apocynin attenuates ischemia-reperfusion lung injury in an isolated and perfused rat lung model. *Transl Res*. 2011 Jul;158(1):17-29.

24. Fischer S, De Perrot M, Liu M, MacLean AA, Cardella JA, Imai Y, et al. Interleukin 10 gene transfection of donor lungs ameliorates posttransplant cell death by a switch from cellular necrosis to apoptosis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Oct;126(4):1174-80.
25. de Perrot M, Fischer S, Liu M, Jin R, Bai XH, Waddell TK, et al. Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury: a shift from pro- to anti-inflammatory cytokines. *Transplantation.* 2001 Nov 15;72(9):1505-12.

Figures

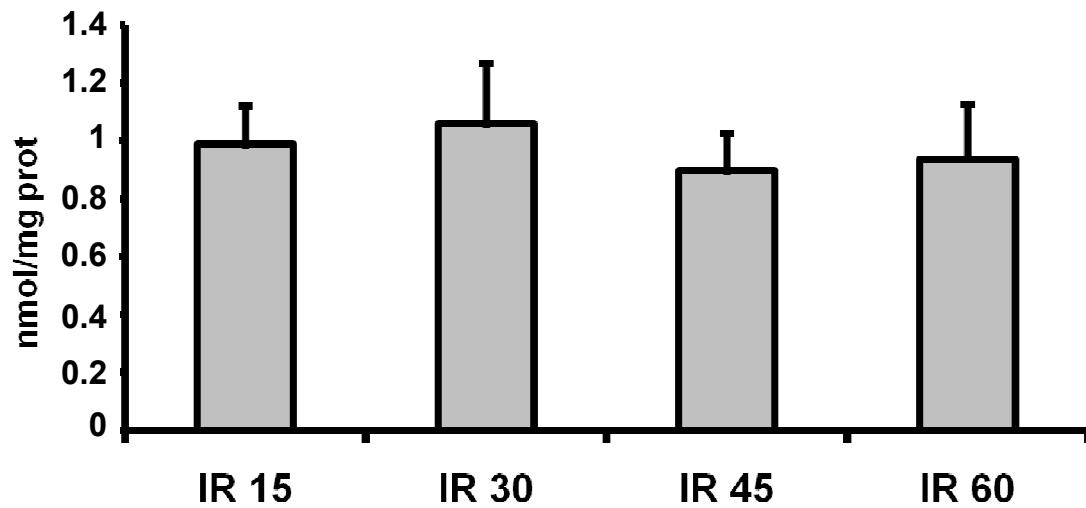


Figure 1 - Effects of different times of ischemia on pulmonary lipid peroxidation, evaluated using the TBARS assay. There was no significant difference between groups ($p > 0.05$). Data are mean \pm standard deviation of the mean.

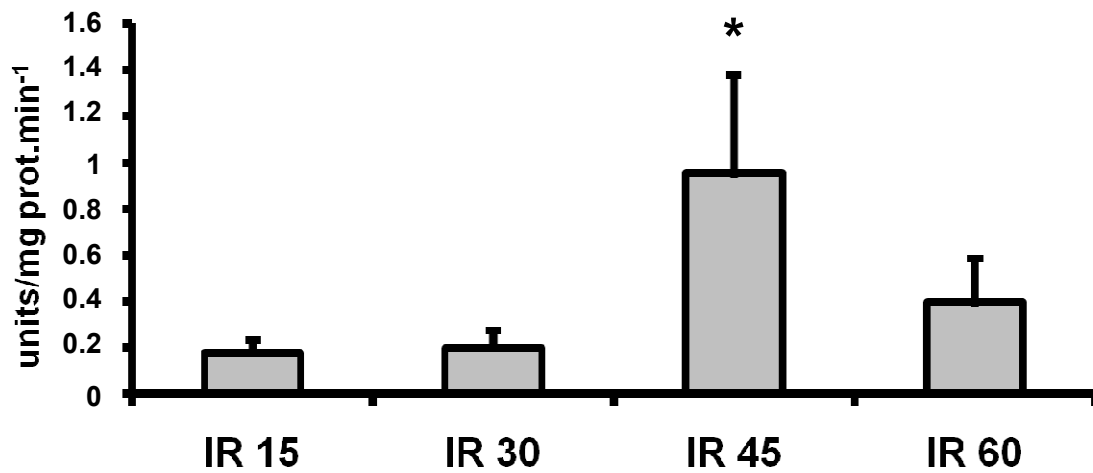


Figure 2 – Caspase 3 activity in different times of ischemia. There was a significant increase of caspase 3 activity in group IR45 (* - $p < 0.01$) when compared with groups IR15, IR30 and IR60. Data are mean \pm standard deviation of the mean.

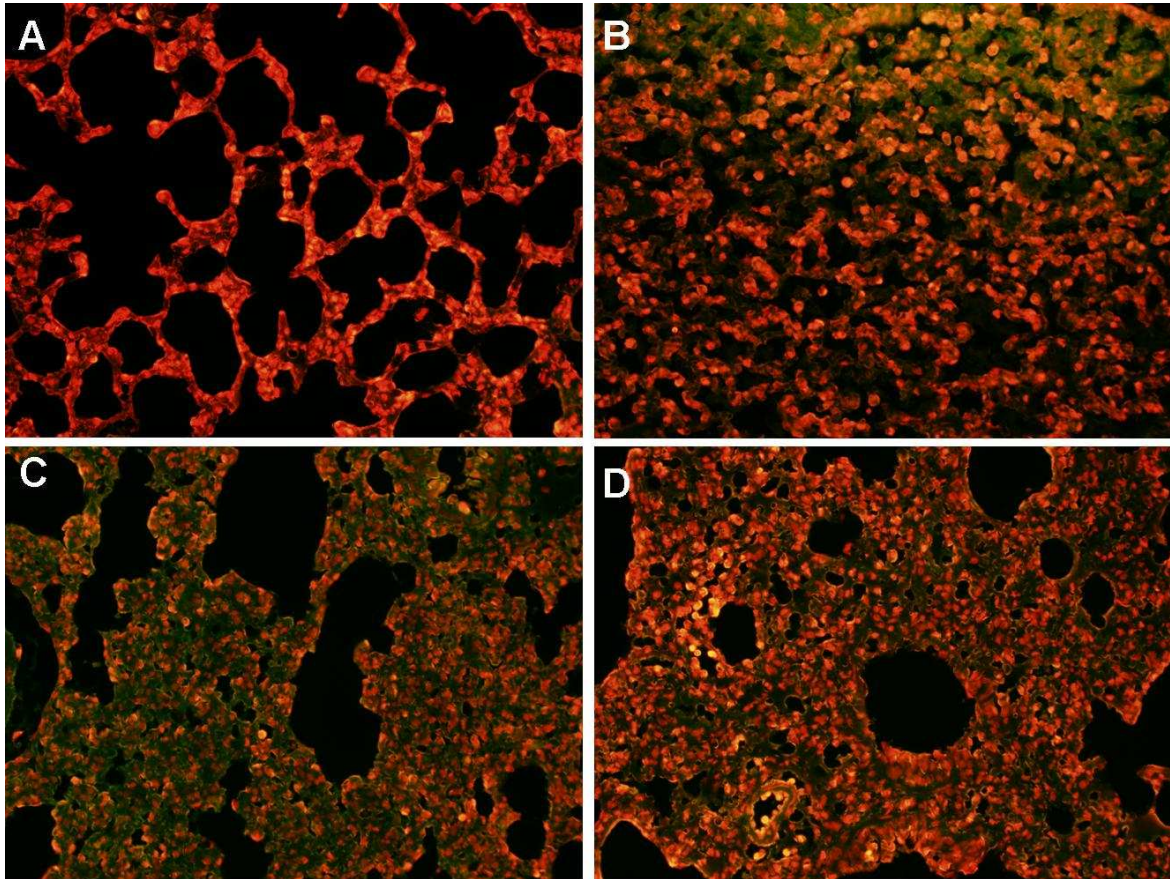


Figure 3 - Apoptosis and necrosis quantification at different time. We observe the maximum increase of apoptosis at the time of 45 minutes of ischemia (C) and necrosis after 60 minutes of ischemia (D). (A – IR15; B – IR30; C – IR45; D – IR60 magnification 200 x)

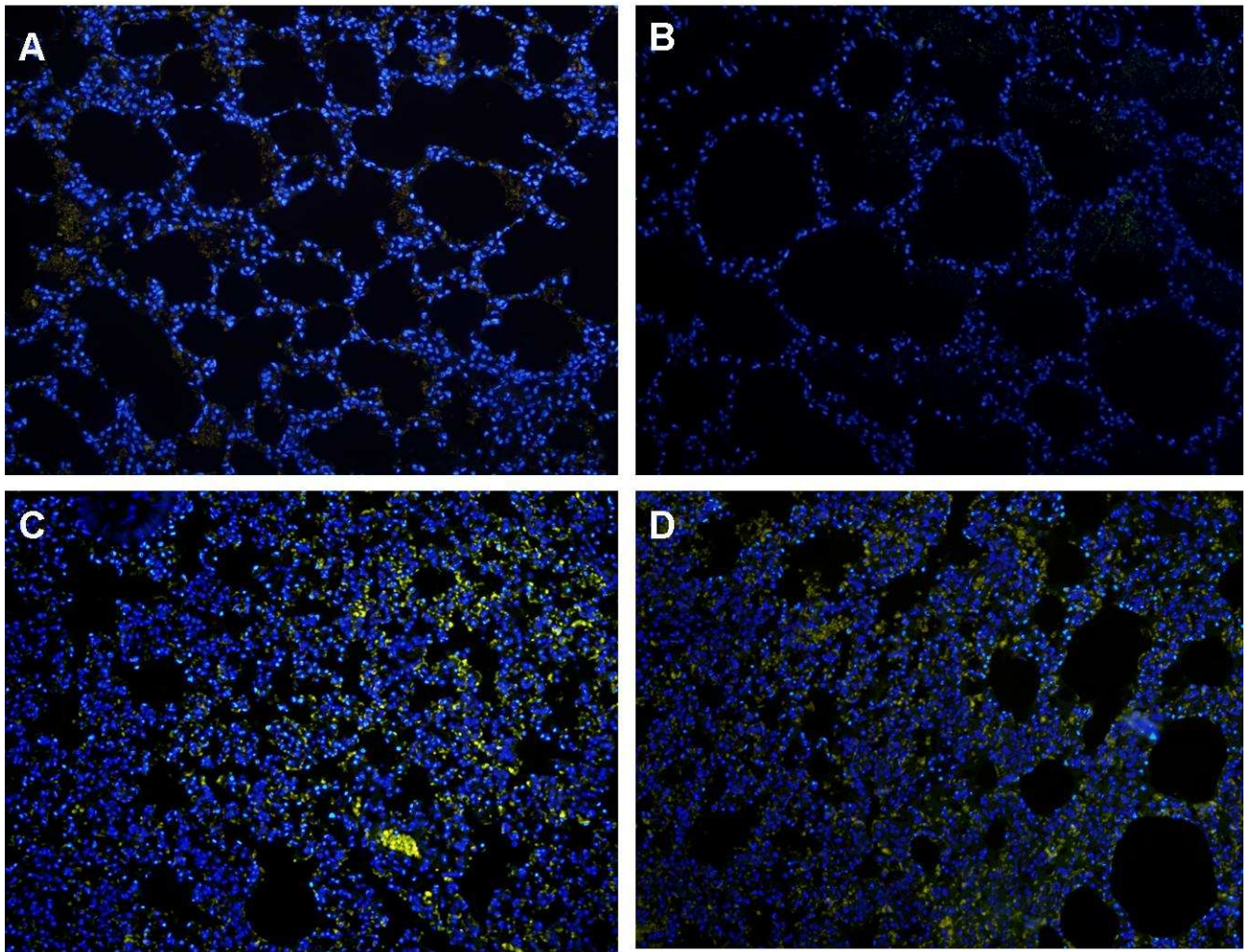


Figure 4 – Caspase 3 Immunofluorescence at different ischemic periods after reperfusion. There was an increase in caspase 3 in IR45 group (C) when compared to other groups (A – IR15; B – IR30; C – IR45; D – IR60).

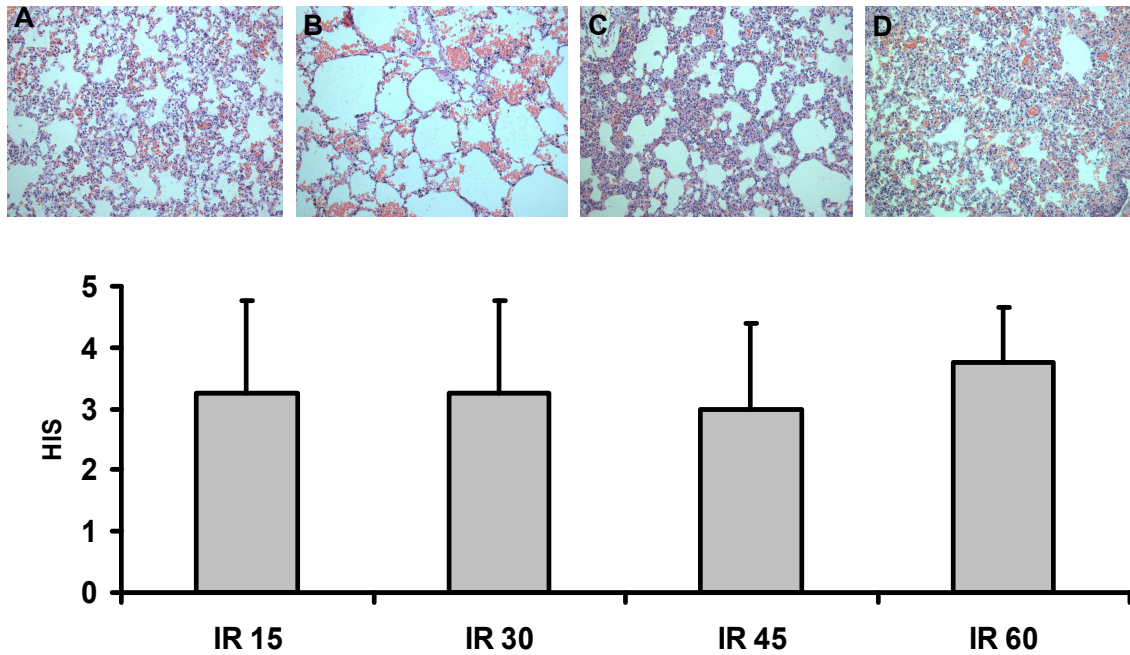


Figure 5 – Photomicrograph of the lung in different times of ischemia. The histological score (HIS) showed no significant difference between groups. (A – IR15; B – IR30; C – IR45; D – IR60 – 200x)

7. Artigo II

Endobronchial perfluorocarbon decreases lung injury in an experimental model of ischemia and reperfusion

Objective - To verify the effects of endobronchial liquid perfluorocarbon (PFC) administered before reperfusion in an animal model of lung ischemia reperfusion injury.

Methods - Eighteen Wistar rats were subjected to an experimental model of selective left pulmonary artery clamping for 45 minutes and reperfusion for 2 hours. The animals were divided in three groups: ischemia-reperfusion (IR), sham and perfluorocarbon (PFC). We recorded hemodynamics parameters, blood gas analysis and histology. Western Blot assay was used to measure iNOS, Caspase 3 and NF- κ B (sub-unit p65) activity. Lipid peroxidation was assessed by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD).

Results - No significant differences were observed in lipid peroxidation. Activity of SOD was increased ($p < 0.05$) in PFC treated group. The expressions of NF- κ B, iNOS and caspase 3 were significantly lower in PFC group when compared to IR group ($p < 0.05$). Histological analysis showed reduction in lung injury in PFC group when compared to sham and IR groups.

Conclusion - The use of endobronchial PFC reduces inflammatory response, preserves alveolar structure and protects the lungs against the hazardous effects of the ischemia reperfusion injury.

Introduction

Ischemia-reperfusion (IR) induced acute lung injury is the major cause of early morbidity and mortality after lung transplantation (1-3). IR injury is exacerbated by the induction of proinflammatory signaling pathways that target the activation of the Nuclear Factor κ B (NF- κ B) (4, 5).

NF- κ B is one important rapid-response transcription factor that is critical to the regulation of apoptosis and expression of inflammatory mediators that significantly contribute to the pathogenesis of IR injury in different settings (6, 7).

Liquid perfluorocarbon (PFC) administered endobronchially was a promising lung protective substance used in different models of lung injury (8, 9) and few clinical trials in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) (10). At present, the so-called partial liquid ventilation with PFC as an alternative to conventional mechanical ventilation has been clinically banned due to the scarce lack of data supporting its benefits in critically ill patients (11). However, liquid PFC has unique physical characteristics such as low surface tension and high respiratory gas solubility. Additionally, PFCs wash out alveoli debris, recruit collapsed alveoli, improve gas exchange, protect pulmonary architecture and importantly they have anti-inflammatory and anti-oxidant properties (12).

The objective of this study is to evaluate whether the use of endobronchial perfluorocarbon reduces activation of NF- κ B and consequently the apoptotic and inflammatory response. Therefore, we used a previously described experimental model of lung ischemia-reperfusion based on the presence of the highest number of apoptotic cells, which would represent the

most severe and potentially reversible ischemic damage. In this scenario, low doses of liquid PFC would protect the lung by reducing the inflammatory cascade through iNOS activation and the apoptotic response mediated by production of caspase 3.

Material and Methods

Animal Model

Animals weighing 250 – 300g were handled in accordance with the Animal Welfare Act and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication 86-23, revised 1996). The Ethical Committee of the Hospital de Clínicas, approved the experimental protocols.

Eighteen rats were randomized in 3 groups (n = 6) according to the surgical procedure: sham group (SHAM), ischemia-reperfusion group (IR) and perfluorocarbon group (IR/PFC).

The animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) via intraperitoneal injections, the anesthesia was maintained with one-third of the initial dose each 30 minutes. Rats were mechanically ventilated using a volumetric ventilator (Harvard Rodent Ventilator, model 683; Harvard Apparatus Co. Millis, MA, USA). The ventilator was set to a tidal volume of 10 mL/kg of body weight, a respiratory rate of 70-80 breaths/min, a fraction of inspired oxygen of 0.2 (room air) and a positive end expiratory pressure of 2 cmH₂O. The animals were submitted to a left thoracotomy as described elsewhere (13). Just before selective arterial clamping, lung expansion was achieved through occlusion of the expiratory valve for three inspiratory cycles,

in order to avoid atelectasis. During the clamping of the pulmonary artery, the animal was maintained on mechanical ventilation in both lungs (13).

Mean systemic arterial pressure (MAP) was measured through cannulation of the right carotid artery (Sirecust 730; Siemens, Solna, Sweden). The same cannula was used for collecting blood samples for arterial blood gas analysis (Blood Gas Analyzer, Siemens Bayer 865, Siemens, Solna, Sweden). Mean systemic arterial pressure and arterial blood gases were measured before thoracotomy (baseline) and 2 hours after reperfusion in the IR and IR/PFC group.

In the SHAM group after tracheotomy and cannulation of the right carotid artery the animals were submitted to a left thoracotomy in the fifth intercostal space, the pulmonary ligament was sectioned, and subsequently, the left pulmonary artery was isolated. In the SHAM group, data from MAP and arterial blood gas analysis were collected before thoracotomy and 2 hours after hilar manipulation.

In the IR group was performed the same procedure as described above. Afterwards, we clamped the pulmonary artery using a vascular microclip (Vicca Neuroclip, Cachoeirinha, RS, Brazil) for 45 minutes. In the IR/PFC group, we performed the same surgical procedure as described to the IR group. Just before clamp release, we used a dose of 7mL/Kg of liquid perfluorocarbon divided in three equal aliquots, which was injected via tracheostomy at one minute interval, in order to achieve a homogeneous lung distribution. After the 120-min period of reperfusion (IR and IR/PFC) or observation (SHAM), the animals were anesthetized and sacrificed. Thus, the left lung was removed and stored at -80° C or stored in 10% formalin.

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)

The tissue samples were placed in assay tubes, to which were added 0.75 mL of 10% trichloroacetic acid, 0.25 mL of the homogenate, 0.5 mL of 0.67% thiobarbituric acid and 25 mL of distilled water. Each tube was agitated and heated to 100°C, after they were cooled in ice 1.5 mL of n-butyl alcohol were added. Subsequently, each tube was agitated in the Vortex (Biomatic, Porto Alegre, RS, Brasil), agitated for 45s and centrifuged for 10 min at 3,000 rpm ($1,110 \times g$). Finally, the stained product was removed and read in a spectrophotometer (CARY 3E UV-Visible Spectrophotometer; Varian, Palo Alto, CA, USA) at a wavelength of 535 nm. The concentration of TBARS obtained was expressed as nmol/mg of protein (14).

Superoxide Dismutase

Cytosolic superoxide dismutase was assayed according to Misra and Fridovich at 30° (15). The rate of auto-oxidation of epinephrine, which is progressively inhibited by increasing amounts of SOD in the homogenate, was monitored spectrophotometrically at 560 nm. The amount of enzyme that inhibits epinephrine autooxidation at 50% of the maximum inhibition was defined as 1 Unit of SOD activity.

Western Blotting

Lung homogenates were prepared from frozen lungs (-80°C) using tissue lysis buffer (50 mM TRIS pH 8.0, 5 mM ethylenediamine tetraacetic acid, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), and a protease

inhibitor cocktail (Sigma©). The lysates were clarified by centrifugation at 13,000 *g* for 15 min at 4°C; 10–30 *g* of protein was separated by either 10% or 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and analyzed for p65, caspase-3 (Cell Signalling Biotechnology, Boston, MA) and iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) expression by immunoblot analysis. Immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham, United Kingdom). Band density was determined using a GS-700 Imaging Densitometer and analyzed with Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) (16, 17).

Lung Histology

Lung tissue specimens were fixed in formalin and dehydrated, cleared, and embedded in paraffin. Specimens were cut into 8- μ m serial sections and stained with hematoxylin-eosin. One blinded pathologist to the experimental protocol and the region of sampling performed quantitative analysis by light microscopy. Each sample was examined under both low and high power fields. At least four sections were obtained from each block, and 20 fields were randomly selected and analyzed for each section. The severity of histological lesions was assessed using a score (HIS - Histological Score) based on six parameters: intra-alveolar edema, hyaline membrane formation, hemorrhage, recruitment of granulocytes into the air spaces, focal alveolar collapse or consolidation, and epithelial desquamation/necrosis of airways or alveoli. Each parameter was evaluated semiquantitatively using the following scale: 0 = absent, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = prominent. In addition, the percentage of the

involved area of each histological specimen was estimated (0 to 100%) to quantify the histological changes (18).

Statistical Analysis

Data were compiled in a spreadsheet (MS Excel 7.0; Microsoft Corporation) and the statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences program, version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The groups were compared through analysis of variance followed by t Student post-hoc test. The level of statistical significance was 5%. Data are presented as mean and standard deviation.

Results

There were no significant differences among the groups regarding blood gas analysis and the quantity of lipid peroxidation products (figure 1). The mean arterial pressure significantly decreased at the end of the observation period in both IR and IR/PFC groups ($p < 0.05$) when compared to baseline (figure 2). The activity of superoxide dismutase was significantly higher ($p < 0.05$) in group IR/PFC when compared to the other groups (IR and Sham groups) at the end of the observation period (figure 3).

There was a significant increase in nuclear translocation of NF- κ B (subunit p65) in IR group when compared to the other groups ($p < 0.05$) (figure 4). There was also a significant increase in iNOS expression and caspase 3 in the IR group ($p < 0.05$) after 2 hours of reperfusion (figure 5 and 6).

Histopathological analysis of the lung tissues did not show any difference between Sham and IR groups. Nevertheless, both groups showed changes in lung morphology characterized by cellular infiltrates, thickening of the alveolar septae and atelectasis, which was not observed in IR/PFC group. When analyzing the severity of histological damage using the previously described histological score (HIS), the PFC treated group significantly reduced lung injury in comparison to Sham and IR groups (figure 7).

Discussion

Several studies including animals and humans have tested the effects of pharmacological intervention tempting reduction of IR injury (22-25). Our IR model reproduces many features described by Chiang et al. and Lu et al. including inflammatory responses and structural lung damage (22, 23). In our study liquid perfluorocarbon when administered endobronchially protected the lung from the hazardous effects of the IR injury.

Perfluorocarbon has a protective role in the surfactant system and alveolar membrane. Although, PFC has a high capacity of diffusion of oxygen and carbonic gas, we did not observe any improvement in gas exchange during this animal model (8, 9, 11). The mean arterial pressure decreased at the end of the observation period in both IR and IR/PFC groups, suggesting that PFC does not cause any additional physiological changes, unlike other studies where high doses of PFC had influence on mean arterial pressure.

PFC seems to have no impact on lipid peroxidation through TBARS quantification analysis. However, SOD activity was increased in IR/PFC group

showing a protective anti-oxidant property. This incongruity may be a result of the technique used for TBARS quantification which is not sensible enough. Perhaps, more sensitive techniques such as isoprostane quantification would provide more specific results.

PFC was able to reduce the nuclear translocation of NF- κ B and consequently decreased apoptotic and inflammatory response. NF- κ B has been shown to be a key player in the pathogenesis of IR injury after lung transplantation, and its inhibition attenuates lung injury improving lung function (19) (22) and reducing apoptotic cell death (26). In our study, NF- κ B activation was triggered after reperfusion while PFC treat group produced a NF- κ B downregulation and reduction of caspase-3 and iNOS expression. Taken together, PFC seems to have anti-inflammatory as well as anti-apoptotic effects.

Nitric Oxide (NO) is produced via iNOS, which was originally identified in platelets and inflammatory cells such as neutrophils and macrophages. It is also widely distributed in the endothelium and vascular smooth muscle. Although synthesis of NO through iNOS is beneficial to maintaining physiological homeostasis, maybe associated with injury in pathophysiological conditions such as IR (27). Yeah et al.(28) using a similar model of IR injury observed a reduction of iNOS expression after use of Aminoguanidine, an iNOS inhibitor, suggesting that iNOS expression may play a critical role in the lung injury induced by IR. In our study PFC appears to have comparable properties to such iNOS inhibitor.

Evidence suggests that increased lung apoptosis could be the mechanism which iNOS cause IR lung injury (29). Quadri et al. studied the effects of caspase inhibitor after cold ischemic storage. They demonstrated that

activation of caspases during cold ischemia contributes significantly to cell death and the suppression of caspase activity appears to decrease apoptosis improving lung function. In our IR model PFC could significantly suppress the expression of caspase 3, suggesting a reduction in cell death (30).

In conclusion, endobronchial PFC when used in our IR injury model showed lung protective properties. The use of PFC improves cell viability and reduces inflammatory response reducing the deleterious effects of the IR injury acting as a potential alternative to the treatment of organ reperfusion.

References

1. Bharat A, Kuo E, Steward N, Aloush A, Hachem R, Trulock EP, et al. Immunological link between primary graft dysfunction and chronic lung allograft rejection. *Ann Thorac Surg.* 2008 Jul;86(1):189-95; discussion 96-7.
2. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Feb 15;167(4):490-511.
3. Huang HJ, Yusef RD, Meyers BF, Walter MJ, Mohanakumar T, Patterson GA, et al. Late primary graft dysfunction after lung transplantation and bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant.* 2008 Nov;8(11):2454-62.
4. Ross SD, Kron IL, Gangemi JJ, Shockey KS, Stoler M, Kern JA, et al. Attenuation of lung reperfusion injury after transplantation using an inhibitor of nuclear factor-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Sep;279(3):L528-36.
5. Ng CS, Wan S, Yim AP. Pulmonary ischaemia-reperfusion injury: role of apoptosis. *Eur Respir J.* 2005 Feb;25(2):356-63.
6. Hirschl RB, Tooley R, Parent A, Johnson K, Bartlett RH. Evaluation of gas exchange, pulmonary compliance, and lung injury during total and partial liquid ventilation in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1996 Jun;24(6):1001-8.
7. Haeberle HA, Nesti F, Dieterich HJ, Gatalica Z, Garofalo RP. Perflubron reduces lung inflammation in respiratory syncytial virus infection by inhibiting chemokine expression and nuclear factor-kappa B activation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 May 15;165(10):1433-8.

8. Itano H, Aoe M, Ichiba S, Yamashita M, Date H, Andou A, et al. Partial liquid ventilation for acute allograft dysfunction after canine lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1999 Feb;67(2):332-9.
9. Loehe F, Mueller C, Bittmann I, Messmer K, Schildberg FW. Influence of long-term preservation with endobronchially administered perfluorodecalin on pulmonary graft function. *Transplantation.* 2000 Nov 27;70(10):1417-24.
10. Hirschl RB, Croce M, Gore D, Wiedemann H, Davis K, Zwischenberger J, et al. Prospective, randomized, controlled pilot study of partial liquid ventilation in adult acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Mar 15;165(6):781-7.
11. Kacmarek RM, Wiedemann HP, Lavin PT, Wedel MK, Tutuncu AS, Slutsky AS. Partial liquid ventilation in adult patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Apr 15;173(8):882-9.
12. Dani C, Costantino ML, Martelli E, Corno C, Fiore GB, Buonocore G, et al. Perfluorocarbons attenuate oxidative lung damage. *Pediatr Pulmonol.* 2003 Oct;36(4):322-9.
13. Junior LAF. Utilização do perfluorocarbono na preservação de enxertos pulmonares submetidos a diferentes períodos de isquemia fria em modelo animal. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
14. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
15. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972 May 25;247(10):3170-5.

16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
17. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.
18. Fujino Y, Goddon S, Chiche JD, Hromi J, Kacmarek RM. Partial liquid ventilation ventilates better than gas ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Aug;162(2 Pt 1):650-7.
19. Ricard JD, Dreyfuss D, Laissy JP, Saumon G. Dose-response effect of perfluorocarbon administration on lung microvascular permeability in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Dec 1;168(11):1378-82.
20. Torres RL, Martins LK, Picoral M, Auzani J, Fernandes TR, Torres IL, et al. The potential protective effect of low potassium dextran against lipid peroxidation in a rat lung transplantation model. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2009 Aug;57(5):309-11.
21. Pilla ES, Vendrame GS, Sanchez PG, Grun G, Fontena E, Forgiarini LA, Jr., et al. Ischemic preconditioning by selective occlusion of the pulmonary artery in rats. *J Bras Pneumol*. 2008 Aug;34(8):583-9.
22. Chiang CH, Pai HI, Liu SL. Ventilator-induced lung injury (VILI) promotes ischemia/reperfusion lung injury (I/R) and NF-kappaB antibody attenuates both injuries. *Resuscitation*. 2008 Oct;79(1):147-54.
23. Lu HL, Chiang CH. Combined therapy of pentastarch, dexamethasone, and dibutylryl-cAMP or beta 2-agonist attenuates ischaemia/reperfusion injury of rat lung. *Injury*. 2008 Sep;39(9):1062-70.

24. Nakano Y, Kondo T, Matsuo R, Murata S, Fukunaga K, Ohkohchi N. Prevention of leukocyte activation by the neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, in the hepatic microcirculation after ischemia-reperfusion. *J Surg Res.* 2009 Aug;155(2):311-7.
25. Lau CL, Zhao Y, Kim J, Kron IL, Sharma A, Yang Z, et al. Enhanced fibrinolysis protects against lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 May;137(5):1241-8.
26. Ishiyama T, Dharmarajan S, Hayama M, Moriya H, Grapperhaus K, Patterson GA. Inhibition of nuclear factor kappaB by IkappaB superrepressor gene transfer ameliorates ischemia-reperfusion injury after experimental lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Jul;130(1):194-201.
27. Sedoris KC, Ovechkin AV, Gozal E, Roberts AM. Differential effects of nitric oxide synthesis on pulmonary vascular function during lung ischemia-reperfusion injury. *Arch Physiol Biochem.* 2009 Feb;115(1):34-46.
28. Yeh DY, Feng NH, Chen CF, Lin HI, Wang D. Inducible nitric oxide synthase expressions in different lung injury models and the protective effect of aminoguanidine. *Transplant Proc.* 2008 Sep;40(7):2178-81.
29. Shaw MJ, Shennib H, Bousette N, Ohlstein EH, Giaid A. Effect of endothelin receptor antagonist on lung allograft apoptosis and NOSII expression. *Ann Thorac Surg.* 2001 Aug;72(2):386-90.
30. Quadri SM, Segall L, de Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, et al. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transplant.* 2005 Feb;5(2):292-9.

31. Meldrum KK, Hile K, Meldrum DR, Crone JA, Gearhart JP, Burnett AL. Simulated ischemia induces renal tubular cell apoptosis through a nuclear factor-kappaB dependent mechanism. *J Urol.* 2002 Jul;168(1):248-52.

Figures

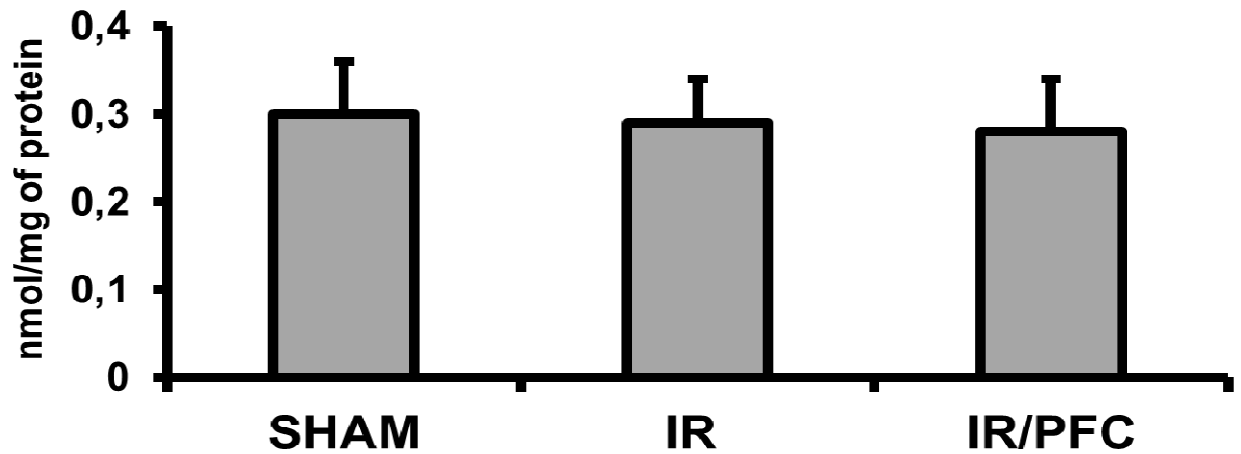


Figure 1 - Effects of ischemia on pulmonary lipid peroxidation after reperfusion, evaluated using TBARS assay. There is no difference among groups ($p>0.05$).

Data are mean \pm standard deviation of the mean.

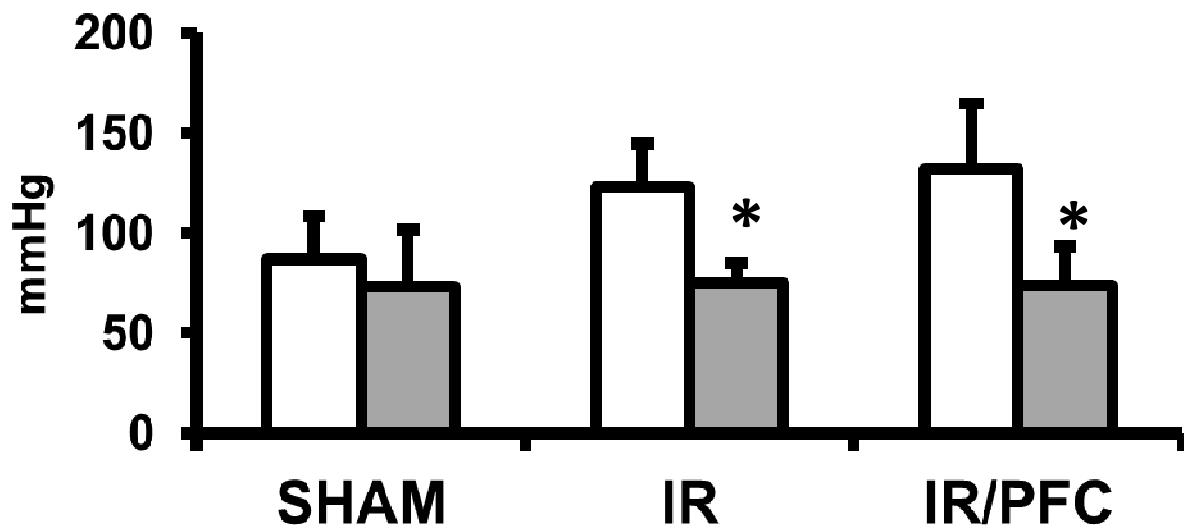


Figure 2 - Effects of ischemia on mean arterial pressure. There is a significant decreased at the end of the observation period in both IR and IR/PFC groups ($p < 0.05$) when compared to baseline. Data are mean \pm standard deviation of the mean.

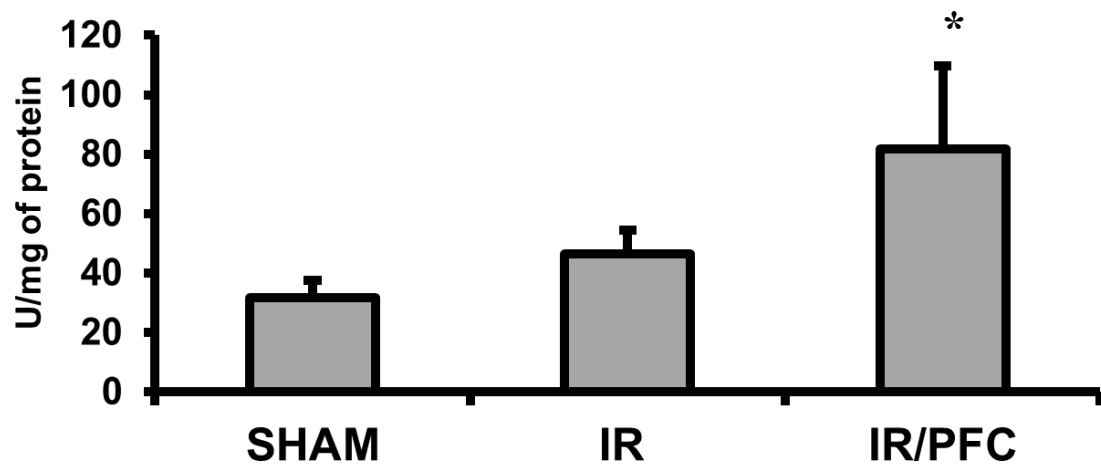


Figure 3 - Effects of ischemia on pulmonary activity of Superoxide Dismutase. There is a significant increase in the PFC group (* $p < 0.05$) when compared with Sham and IR groups. Data are mean \pm standard deviation of the mean.

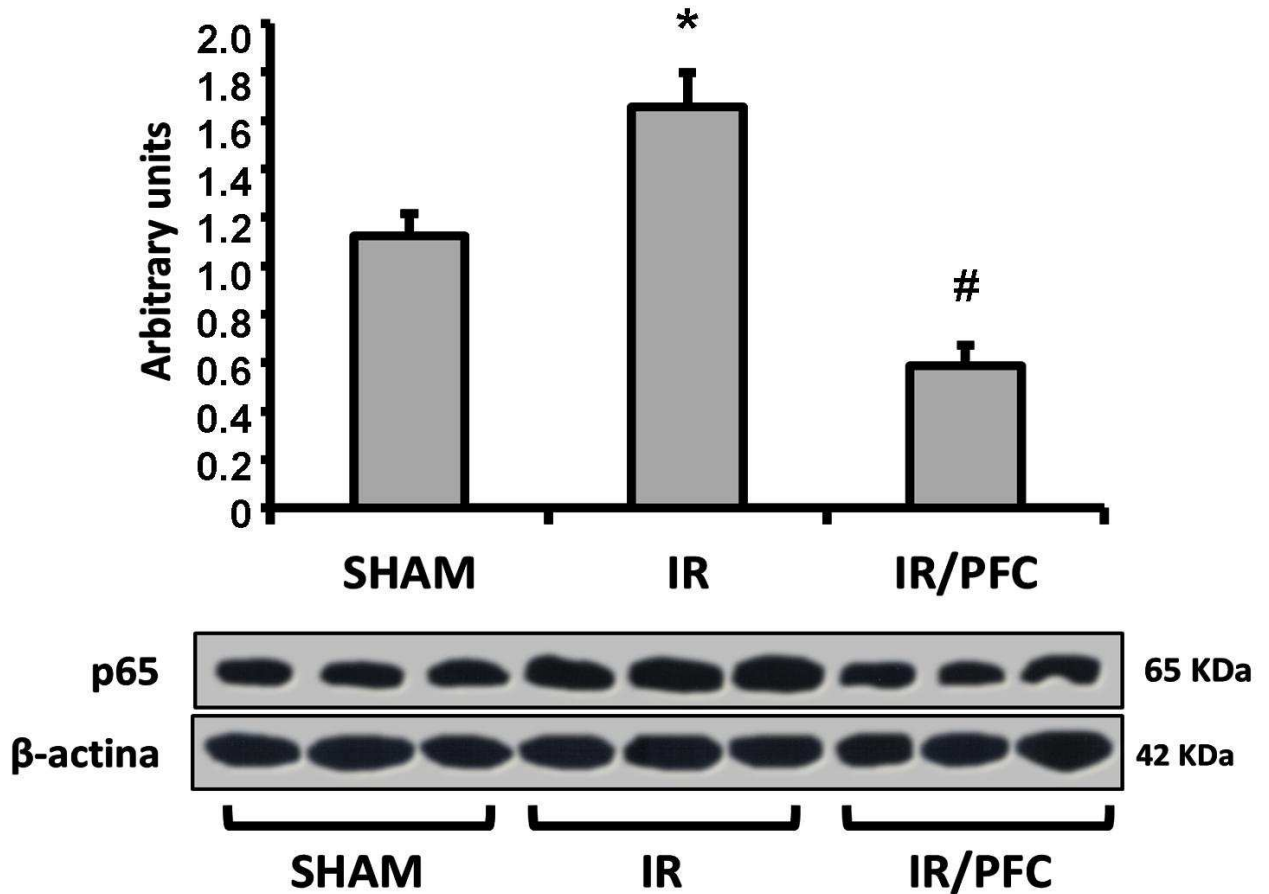


Figure 4 – Expression of NF- κ B in lung tissue. Overexpression of NF- κ B was found in the IR group (* $p < 0.05$), but PFC attenuated the NF- κ B expression when compared to IR and SHAM groups (# $p < 0.05$). The images are representative samples of groups.

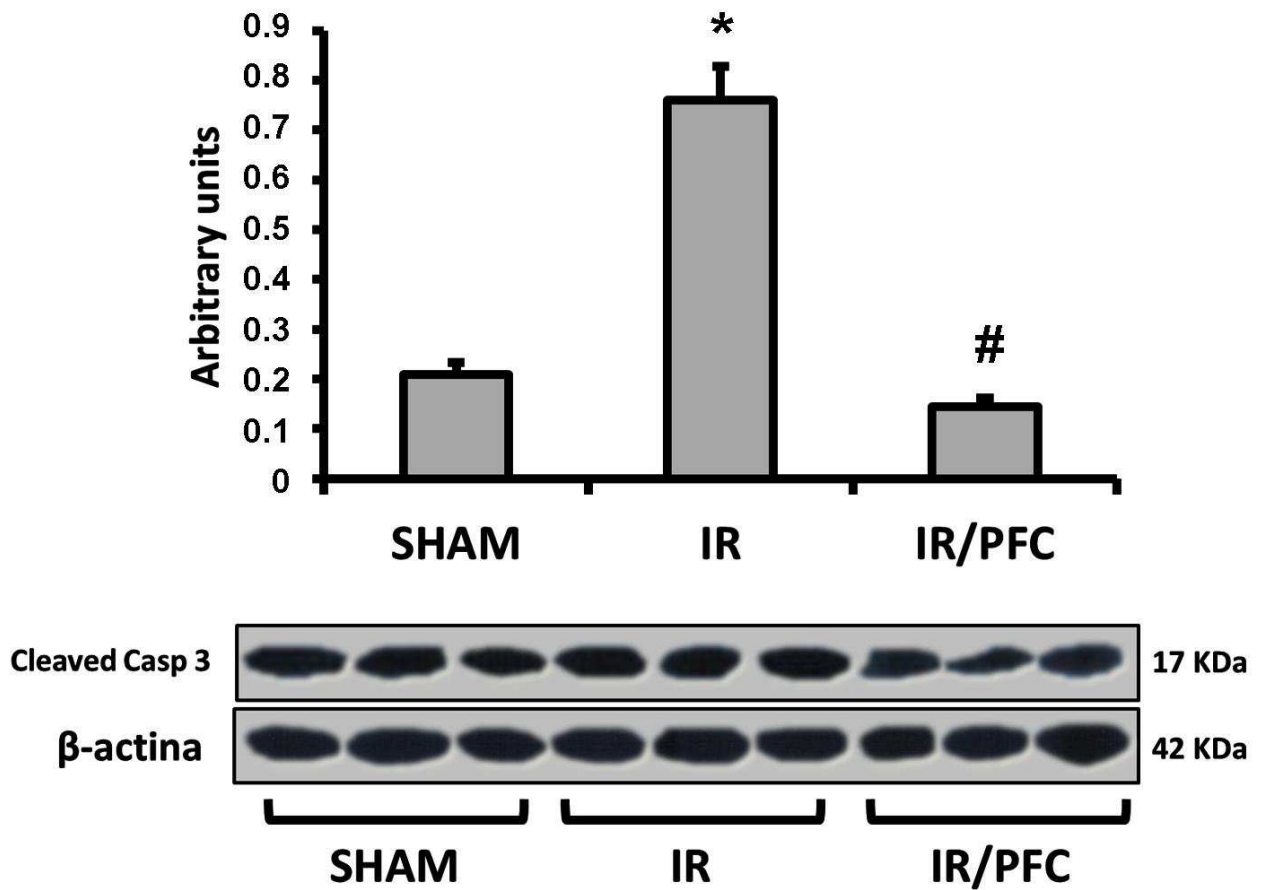


Figure 5 - Caspase 3 expression in lung tissue. IR group induced overexpression of caspase 3 (* $p < 0.05$). PFC group significantly attenuated caspase 3 expression after reperfusion (# $p < 0.05$). The images are representative samples of groups.

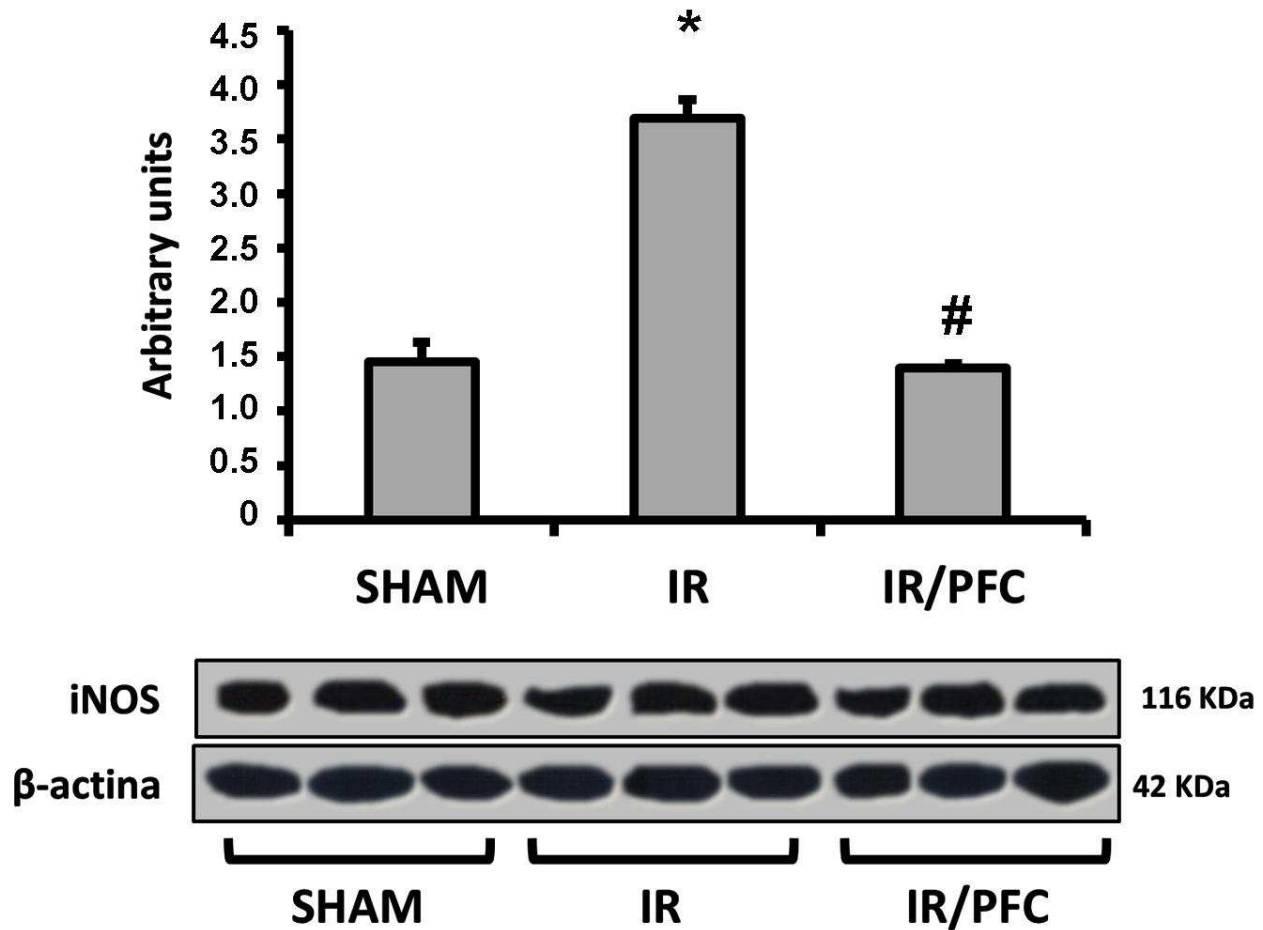


Figure 6 – Effect of PFC and IR on iNOS expression. There was a significant mean of iNOS expression after reperfusion in the IR group when compared IR/PFC and SHAM group (* $p < 0.05$). PFC treated animals present a significant reduction of iNOS after reperfusion with values similar than the SHAM group (# $p < 0.05$). The images are representative samples of groups.

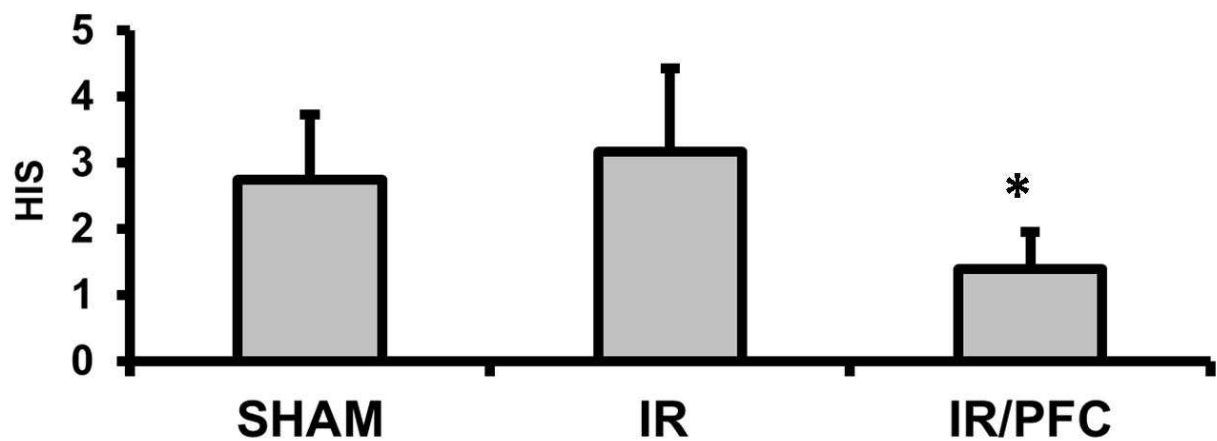
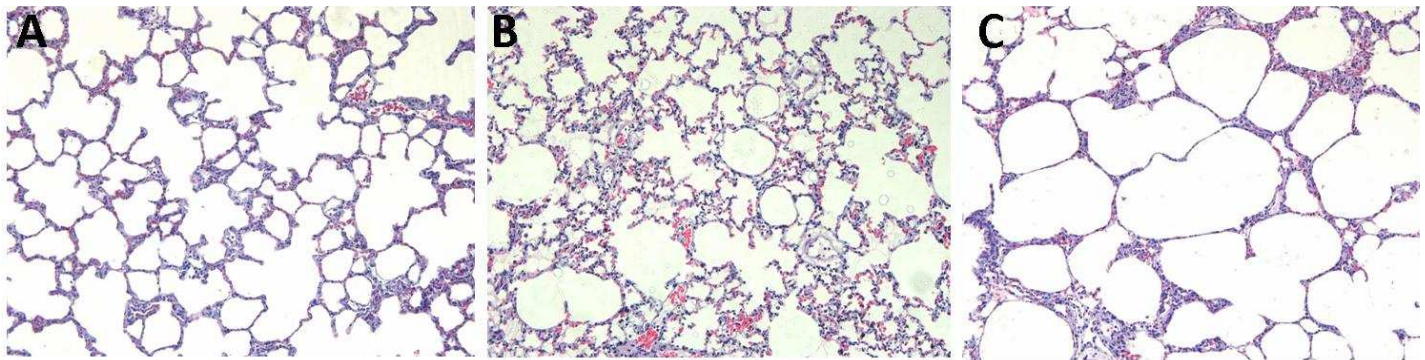


Figure 7 – Histological score after reperfusion. PFC reduces lung injury when assessed by histology ($\times 200$ magnification). Lung injury observed in IR group (B) represented by perivascular edema, intraalveolar hemorrhage, interstitial, and intraalveolar leukocyte infiltration in the Sham (A). PFC lung histology (C). HIS (Histological Score) demonstrated a reduction in lung injury in group IR/PFC when compared to SHAM and IR group ($p < 0.05$).

8. Artigo III

Endobronchial perfluorcarbon confers lung protection before and after transplantation in an animal experimental model

Objective - To evaluate the use of liquid perfluorcarbon (PFC) as an adjuvant substance for lung preservation and assess its role on pulmonary protection after transplantation. Methods - Seventy-two rat lungs were flushed with low potassium dextran (LPD) solution and randomized into three main groups: control (CO) with LPD solution alone and 3 ml/kg (PFC3) and 7 ml/kg (PFC7) of endobronchial PFC instilled just after harvest. Each group was divided into four subgroups (n = 6) according to preservation time (3, 6, 12 and 24 hours). Afterwards, we performed lung transplantation using rat lungs preserved for 12 hours with LPD alone (control group, n=6) or associated to 7ml/kg of endobronchial PFC (PFC7, n=6). We analyzed lipid peroxidation, caspase 3 activity, nuclear factor-kappa B (NF-kB), nitric oxide synthase (iNOS) and nitrotyrosine expression as well as histological changes of lung grafts before and after transplantation. We recorded hemodynamics and blood gas analysis from the transplanted animals until sacrifice at 120 min. Results - There was a significant increase in lipid peroxidation in CO group at 6 hours of cold ischemic time when compared to groups PFC3 e PFC7 ($p<0.05$). Apoptotic activity and NF-kB expression were significantly higher in CO group when compared to PFC groups at 3, 12 and 24 hours of cold preservation ($p<0.05$). After transplantation both groups did not show differences in hemodynamics and blood gas analysis. NF-kB, iNOS and nitrotyrosine expression as well as caspase 3 activity were significant lower in PFC group.

Conclusion - The use of endobronchial PFC as an adjuvant to the current preservation strategy has improved both graft preservation and the early function following lung transplantation.

Introduction

Lung transplantation is an established therapy for patients with end-stage lung disease (1). In the early post operative period, recipients may present with severe complications such as ischemia-reperfusion (IR) injury, acute rejection and infection (2). IR injury affects up to 20% of patients following lung transplantation and may lead to primary graft failure increasing morbidity/mortality (3).

Primary graft failure is the end-result of a series of events occurring from the time of brain death to the time of lung reperfusion after transplantation (4). Strategies to prevent lung dysfunction resultant from IR injury have been focused on selective assessment of donor lungs (5), effective technique of lung preservation (6), and careful management of transplanted lungs after reperfusion (7).

The early stage of reperfusion injury following lung transplantation is initially mediated by the innate immune response through activation of alveolar macrophages in the lung donor with consequent production of proinflammatory cytokines that exacerbates the inflammatory response resulting in cell death thorough an apoptotic pathway (8-10). Longer ischemic periods lead parallels with an escalating proportion of cell death, resulting in a significant derrangement in lung function, which suggests a positive correlation between preservation time and organ performance (11). This inflammatory response and induction of apoptosis may be mediated by nuclear transcription factor kappa beta (NF- κ B), which would trigger the post-transplant lung injury and cell death pathways (8, 12).

Numerous studies have been performed to optimize the technique of lung preservation (13-17). Lung retrieval for transplantation includes flushing of the lungs with hypothermic preservation solution in order to decrease its metabolic rate and energy requirements during storage (18). Although hypothermia remains an essential component of organ preservation strategy, it is nevertheless associated with a series of events that may induce upregulation of molecules on the cell surface membrane and proinflammatory mediators (19).

Liquid perfluorocarbons (PFC) administered endobronchially have been used in different models of lung injury (20, 21), primarily as an alternative method of lung ventilation, known as partial liquid ventilation (17). PFCs wash out alveoli debris, recruit collapsed alveoli, improve gas exchange, protect pulmonary architecture and also have anti-inflammatory and anti-oxidant properties (22, 23). There is a the limited number of studies using endobronchial PFC in the setting of lung transplantation, with conflicting results (24).

The objective of this study is to evaluate the use of liquid PFC as an adjuvant for lung preservation and to evaluate its role as a lung protective substance after transplantation. The study was designed to test both the impact of different PFC doses at different preservation periods, and to evaluate the effects of PFC on cell death, inflammatory response and oxidative stress on the transplanted lung grafts.

Materials and Methods

The protocols for all experiments involving animal surgery were approved by the local Research Ethics Committee. All animals received humane care in accordance with the Nacional Research Council (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH revised 19). Male Wistar Rats from the hospital's central animal laboratory weighing between 250g and 300g were used for all animal experiments.

PFC dose *versus* preservation time studies

In order to define the amount of PFC administered for endobronchial lung preservation we evaluated three different dose regimens. At first, we tested 3, 7 and 15ml/kg of body weight of PFC given endobronchially in a pilot study. Twenty male Wistar rats were divided into four groups (n=5) according to the dose of perfluorocarbon. One control group did not use PFC. The animals were anesthetized (ketamine 100mg/kg and xylazine 15mg/kg) administered intraperitoneally and ventilated with a tidal volume of 10 mL/kg of body weight, a respiratory rate of 70-80 breaths/min, a fraction of inspired oxygen of 0.2 (room air) and a positive end expiratory pressure of 2cmH₂O (Harvard Rodent Ventilator, model 683; Harvard Apparatus Co. Millis, MA, USA). Animals were ventilated for 15 minutes to stabilize the physiological parameters. According to the calculated dose of PFC for each group, the dose was divided into three equal aliquots that were administered at one-minute intervals in order to achieve a homogeneous distribution. Following the administration of PFC, the animals were ventilated for 30 minutes and the heart-lung block was harvest for histological and morphometric analysis. The morphometry was based on the

technique established by Weibel et al. (25) consisting of checking the number of times that the structures of the lung parenchyma intersect a set of straight lines (figure 1).

Upon completion of the dose study, another 72 male Wistar rats weighing 250-300g were used for of the dose versus preservation time study. The animals were prepared for pulmonary perfusion as described elsewhere (26). Preservation was carried out using 20 ml of low-potassium dextran glucose preservation solution (LPD) at 4°C via antegrade cannulation of the pulmonary artery with drainage of the effluent via the left atrium. After flushing, lungs were removed and randomized into 3 groups: Control (CO) in which lungs were flushed with LPD; PFC 3 ml/Kg (PFC 3) and PFC 7 ml/Kg (PFC 7) administered endobronchially and perfused with LPD solution. Each group was divided into four subgroups (n=6) according to preservation time (3, 6, 12 and 24 hours).

Analysis of the variations of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), activity of caspase 3, NF- κ B (subunit p65) and TUNEL staining in lung grafts were used to assess the quality of lung preservation.

Orthotopic left lung transplantation study groups

Orthotopic left lung transplantation was done using the modified cuff technique we have previously described (26). Briefly, after general anesthesia with intraperitoneal Ketamine and Xylazine (100mg/kg and 15 mg/kg of body weight respectively), orotracheal intubation, mechanical ventilation, anticoagulation (300U heparin) and median sternolaparotomy, donor rat lungs were submitted to an antegrade flush via pulmonary artery with 20mL of cold (4°C) LPD solution at 20cm H₂O of pressure. The heart-lung block was

extracted with the lungs inflated at end-tidal volume. The left lung graft was isolated, prepared and stored in LPD at 4°C for 12 hours. Recipient animals were anesthetized, intubated (14-gauge catheter), ventilated underwent a left thoracotomy and the pulmonary vessels and left bronchus were anastomosed with a standard cuff technique (9).

In the lung transplant group (LTx/LPD group), transplantation was performed as described elsewhere (26). In the LTx/PFC group, the PFC was instilled endobronchially prior heart-lung harvest. After 12 hours of cold ischemia, lung transplantation was performed in the same fashion as for the LTx/LPD group. After 120 minutes of reperfusion, the animals were sacrificed. The left lung was removed and stored at -80°C and the right lung was stored in 10% formalin.

Oxidative Stress and Antioxidant Enzymes

The amount of aldehydes generated by lipid peroxidation was measured by the TBARS method, which measures the amount of substances reacting with thiobarbituric acid. The samples were incubated at 100°C for 30 minutes after addition of 500µL of 0.37% thiobarbituric acid in 15% trichloroacetic acid and centrifuged at 3000rpm (1612.8 x *g*) for 10 minutes at 4°C. Absorbance was determined spectrophotometrically at 535 nm (27). The analysis of superoxide dismutase (SOD) was based on the inhibition of the reaction of the superoxide radical with adrenalin (28). The analysis of catalase (CAT) activity was based on measuring the decrease in hydrogen peroxide (29).

Caspase 3 activity assay

Frozen lung tissue was washed twice with ice cold PBS and homogenized by adding ice cold lysis buffer containing 25 mM HEPES, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 25 mM NaF, 1 mM Sodium Orthovanadate and protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). The extract was transferred to a microfuge tube and centrifuged for 10 min at 15,000 g. The supernatants were collected and stored at -20° C. The homogenates were incubated for 60 min at 37°C in a buffer 20 mM HEPES, Glycerol 10%, DTT 2 mM, pH = 7.5 containing 100 μ M concentration of the specific colorimetric substrates 7-amino-4-methylcoumarin N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valil-L-aspartic acid amide (Ac-DEV-AMC) for caspase-3, (Alexis Biochemicals, Cornerstone, San Diego, CA, USA). Cleavage of the colorimetric caspase-3 substrate was monitored using colorimetric Microplate reader (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at emission of wavelengths of 460 nm. Activity was expressed as colorimetric units per milligram of protein per min of incubation.

TUNEL staining and cell counts

TUNEL studies were carried out on lung samples preserved in 10% neutral buffered formalin (EM Science, EM industries Inc., Gibbstown, NJ). Samples were embedded in paraffin, cut into 5- μ m thick tissue slices and mounted on glass slides. TUNEL was performed using the ApopTag Kit (Serologicals Corp., Norcross, GA) with minor modifications to the manufacturer's instructions (TdT enzyme was applied for 2 h at 37°C and the anti-digoxigenin-fluorescein (FITC) was applied for 40 min at room temperature)

(23). The slides were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma Chemicals Co., St Louis, MD) for 10 min and mounted with Antifade (Serologicals). The slides were viewed immediately using a fluorescence microscope (Olympus Zeiss fluorescence microscope, Olympus, Japan). The PI staining (blue) was first examined through a 520-nm filter. In PI stains all nucleated cells (alive, necrotic, and apoptotic) were examined in the same manner. The same area viewed for the PI staining was then examined for apoptotic staining (bright green), using a 590 nm filter at a 400x magnification.

Western Blotting

Lung homogenates were prepared from frozen lungs (-80°C) using tissue lysis buffer (50 mM TRIS pH 8.0, 5 mM ethylenediamine tetraacetic acid, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), and a protease inhibitor cocktail (Sigma Chemicals Co., St Louis, MD). The lysates were clarified by centrifugation at 13,000 g for 15 min at 4°C; 10–30 g of protein were separated by either 10% or 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and analyzed for p65, caspase 3 and nitrotyrosine (Cell Signalling Biotechnology, Boston, MA) and iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) expression by immunoblot analysis. Immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham, United Kingdom). Band density was determined using a GS-700 Imaging Densitometer and analyzed with Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) (30, 31).

Immunofluorescence

I κ B and caspase 3 immunohistochemical staining was performed on paraffin-embedded sections after deparaffination in ethanol, xylene and water. First, primary antibody (polyclonal anti-I κ B and anti-caspase 3 (Cell Signalling Biotechnology, Boston, MA) at 1:1000 was incubated overnight at 4°C. Cy3-conjugated goat anti-rat secondary antibody (Sigma Aldrich, USA) at 1:200 was incubated for 1h. Goat serum and the primary rat antibody were used as a negative control. Mounted slices were visualized within 2 hours on an Olympus Zeiss fluorescence microscope.

Lung Histology

Lung tissue specimens were fixed in formalin, dehydrated, cleared, and embedded in paraffin. Specimens were cut into 8- μ m serial sections and stained with hematoxylin-eosin. One pathologist blinded to the experimental protocol and the region of sampling, performed quantitative analysis by light microscopy. Each sample was examined under low and high power fields. At least four sections were obtained from each block, and 20 fields were randomly selected and analyzed for each section. The severity of histological lesions was assessed using a score (HIS-Histological Score) based on six parameters: intra-alveolar edema, hyaline membrane formation, hemorrhage, recruitment of granulocytes into the air spaces, focal alveolar collapse or consolidation, and epithelial desquamation/necrosis of airways or alveoli. Each parameter was evaluated semiquantitatively using the following scale: 0=absent; 1=mild; 2=moderate; 3=prominent. In addition, the percentage of the involved area of

each histological specimen was estimated to quantify the histological changes (32).

Statistical Analysis

All data are expressed as mean \pm SD. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine statistical significance. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. When statistical significance was reached, it was followed by a *post hoc* analysis using the Student–Newman–Keuls test. Data was analyzed using SPSS version 16.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Results

High dose of PFC results in alveolar overdistention

A reduction in linear intersepts was found when PFC7 lungs were compared to CO lungs ($p < 0.05$). However, the PFC15 lungs showed a more pronounced reduction in number of crossed septa if compared to PFC3 and PFC7 lungs ($p < 0.05$) (figure 1). Additionally, all PFC15 lungs presented rupture of alveolar septae due to overdistention.

PFC reduces lipid peroxidation during lung preservation

When lipid peroxidation was evaluated across the different lung preservation periods, there were significant differences between groups PCF3 and PFC7 in the quantity of lipid peroxidation products at three hours of preservation ($p < 0.05$). At six hours, we observed a significant increase in

TBARS in the control group when compared to PFC3 and PFC7 ($p < 0.05$). However, at 24 hours of preservation, there were no differences between the groups with and without PFC (figure 2).

PFC maintains cell viability during different periods of preservation

When apoptosis was measured by caspase 3 activity, a significant increase in the lungs of control groups was observed when compared to groups using PFC in lung preservation in lungs submitted to 6, 12 and 24 hours of storage ($p < 0.05$) (figure 3). The TUNEL staining showed the presence of FITC-positive cells (TUNEL-positive) in larger number at 3 and 12 hours of preservation. (figure 4).

PFC reduces translocation of NF- κ B

The expression of NF- κ B was significantly reduced at 3, 12 and 24 hours of preservation in the PFC lungs when compared to CO lungs ($p < 0.05$). However, after 24 hours of lung preservation, a significant reduction in the expression of NF- κ B in PFC7 group was found when compared to the lungs in the PFC3 group ($p < 0.05$) (figure 5).

PFC protects the lungs after transplantation from oxidative stress and increases antioxidant enzymes

There were no differences in lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes between PFC and CO groups in both TBARS and catalase assays (figure 6a and c). The activity of superoxide dismutase was significantly higher in the group LTx/PFC when compared to the LTx group ($p < 0,05$) (figure 6b).

PFC reduces inflammation and apoptosis after lung transplantation

After lung transplantation there was a significant increase in nuclear translocation of NF- κ B (subunit p65) in the CO group when compared to the PFC group ($p < 0.05$) (figure 7). There was also a significant increase in iNOS expression and caspase-3 expression in the CO group ($p < 0.05$) when compared to PFC group (figure 8 and 9). The same pattern was observed for nitrotyrosine (figure 10).

PFC reduces caspase-3 expression and increases expression of NF- κ B inhibitor (I κ B)

When we evaluated apoptosis by immunofluorescence and inhibition of NF- κ B by its inhibitor I κ B, we observe an increase in caspase 3 and a reduction in I κ B in the CO group. However, lungs subjected to preservation with liquid PFC showed a decrease in caspase 3 and inhibition of phosphorylation of the inhibitor I κ B (figure 11A and B).

Lung preservation with PFC reduces morphological changes after lung transplant

Histopathology of lungs of the CO group showed severe changes in lung morphology characterized by cellular infiltrates, thickening of the alveolar septae and atelectasis, which were not observed in the PFC group. The analysis of the severity of histological damage using the histology score (HIS), showed a statistically significant reduction in lung injury in the PFC group when compared with the CO group (figure 12).

Discussion

Our results showed that liquid perfluorocarbon administered endobronchially were able to improve lung preservation and reduced the deleterious effects of IR injury. To our knowledge, this is the first report of such benefits on lung preservation in this experimental model of lung transplantation.

Initially, the PFC was administered into the airways to enhance graft preservation and to evaluate two different PFC doses at four distinct cold preservation times. Both PFC doses (3 and 7mL/Kg) were able to reduce cell apoptosis and inflammatory response for up to 12 hours of preservation in comparison to the CO group. Our study differs from Fischer's study (11) who showed almost no apoptosis and cell death of rat lungs preserved at 12hs. However, these authors showed a significant increase in cell death at 18 and 24h of preservation which was similar to our findings. This slight variability may derive from the different techniques employed to demonstrate apoptosis in both studies.

In our study, the PFC has yielded a significantly reduction in caspase 3 activity up to 24hs, which is an indicator that PFC may provide an additional protection to the grafts. However, when we used TUNEL staining we observed a significant decrease of TUNEL-positive cells at 7mL/kg, showing less necrotic cells at 24 hours.

Another important player during graft preservation is the presence of NF- κ B, one important rapid-response transcription factor which is critical to the regulation of apoptosis and has been shown to trigger the inflammatory

response after transplantation (8, 12) through activation of its subunit p65. Our study showed that 7ml/Kg of PFC significantly reduced p65 activity in comparison to 3mL/Kg at 24 hours. This has enabled us to define the dose of 7mL/kg as the ideal that confers longer graft preservation with less inflammatory activity.

In our experimental lung transplantation model we used lungs preserved for 12hours that corresponded to the highest expression of apoptotic cells in the control group, this finding would represent potentially reversible cell activity.

Perfluorocarbon has a protective role in the surfactant system and alveolar membrane (33). Although, PFC has a high oxygen and CO₂ diffusion capacity , we did not observe any substantial improvements in gas exchange after lung transplantation in both groups. This findings can be related to the ischemic time, because at 12 hours the number o necrotic cells was not sufficient to induce detectable physiologic changes. Additionally, in this model of lung transplantation, mean arterial pressure was similar in both groups demonstrating that PFC did not lead to any hemodynamic imbalance in the post-transplant period.

The assessment of oxidative stress by means of catalase and TBARS was not sensitive enough in our model. Perhaps other tests such as isoprostane quantification can demonstrate much earlier changes in this setting. Similar results have been found in a previous study by Pilla et al (10) in an animal model of ischemic preconditioning. On the other hand, studies that used different techniques have found significant differences in oxidative stress in a similar animal model of lung transplantation (9, 34). Lastly, endobronchial PFC

has been shown to protect lungs against reactive oxygen species after lung transplantation as demonstrated by an increase in superoxide dismutase (35).

Lungs transplanted after longer preservation periods have severe IR injury, a significant lung function impairment and an increased number of dead cells (19). It has been shown that the suppression of caspase activity correlates with a decrease in apoptosis and improvements in lung function (27).

Our study demonstrated that PFC can significantly suppress the expression of caspase 3, thus suggesting that there is a reduction in cell death. Quadri et al. (36) demonstrated that the beginning of the cell death process seems to occur at a much earlier stage of IR injury than it was previously thought. Caspase 3 and 8 had significantly increased its activity immediately after flushing the lungs with LPD. Such findings suggest that mechanisms underlying IR injury as well as programmed cell death start quite early in IR injury and it remains affecting the intracellular processes even during the cold ischemic storage.

Induction of iNOS can be beneficial or detrimental, depending on the insult, the amount of expression, and redox status of the tissues (37). IR activates oxidative enzymes, leading to massive release of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anions (38). ROS production affects iNOS induction which may cause excessive NO that outcompetes antioxidants for ROS scavenging, forming secondary reactive products such as nitrosonium cation (NO⁺), nitroxil anion (NO⁻), and peroxynitrite (ONOO⁻), known as reactive nitrogen species (RNS)(39).

Aminoguanidine is known as an inhibitor of the iNOS enzyme and nitrosative stress in IR models of selective clamping of the pulmonary artery

(40). The same study demonstrated that IR can induce lung injury by the activation of systemic inflammatory responses and the induction of iNOS expression. The administration of Aminoguanidine attenuated the injury, suggesting that the iNOS expression played an important role in the lung injury induced by IR.

In our study PFC significantly reduced iNOs expression post transplantation, indicating its anti inflammatory and lung protective properties against IR. In addition, the PFC's chemical and physical properties confers an additional protection to the lungs maintaining preventing alveolar collapse and preserving the alveolar structure. The pathological consequences of IR injury were significantly reduced when PFC was used in our study.

The rationale for using PFC is mostly to protect the lungs once lung injury has been established (42). Based on such observations and the results of the present study, it is reasonable to propose that PFC can also be used before the onset of severe lung injury. In this setting lung transplantation can be a suitable model in which the PFC can provide both graft protection and reduction of the IR injury.

We conclude that in the present animal model, the use of endobronchial PFC as an adjuvant to the current preservation strategy has improved graft both preservation and the early function following lung transplantation. Future studies in a larger animal model are necessary to confirm the present findings.

References

1. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: eighteenth Official Report-2001. *J Heart Lung Transplant*. 2001 Aug;20(8):805-15.
2. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report-2009. *J Heart Lung Transplant*. 2009 Oct;28(10):1031-49.
3. Sommer SP, Sommer S, Sinha B, Wiedemann J, Otto C, Aleksic I, et al. Ischemia-reperfusion injury-induced pulmonary mitochondrial damage. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Jul;30(7):811-8.
4. Christie JD, Kotloff RM, Ahya VN, Tino G, Pochettino A, Gaughan C, et al. The effect of primary graft dysfunction on survival after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jun 1;171(11):1312-6.
5. Cypel M, Yeung JC, Keshavjee S. Novel approaches to expanding the lung donor pool: donation after cardiac death and ex vivo conditioning. *Clin Chest Med*. 2011 Jun;32(2):233-44.
6. Thabut G, Mal H, Cerrina J, Dartevielle P, Dromer C, Velly JF, et al. Graft ischemic time and outcome of lung transplantation: a multicenter analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Apr 1;171(7):786-91.
7. Kroegel C, Hekmat K, Moser A, Happe J, Walther R, Reissig A. [Airway complications following lung transplantation - clinic, diagnosis, and interventional management]. *Pneumologie*. 2011 May;65(5):293-307.
8. Ishiyama T, Dharmarajan S, Hayama M, Moriya H, Grapperhaus K, Patterson GA. Inhibition of nuclear factor kappaB by IkappaB superrepressor gene transfer ameliorates ischemia-reperfusion injury after experimental lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 Jul;130(1):194-201.
9. Torres RL, Martins LK, Picoral M, Auzani J, Fernandes TR, Torres IL, et al. The potential protective effect of low potassium dextran against lipid

peroxidation in a rat lung transplantation model. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Aug;57(5):309-11.

10. Pilla ES, Vendrame GS, Sanchez PG, Grun G, Fontena E, Forgiarini LA, Jr., et al. Ischemic preconditioning by selective occlusion of the pulmonary artery in rats. *J Bras Pneumol.* 2008 Aug;34(8):583-9.

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

12. Chiang CH, Pai HI, Liu SL. Ventilator-induced lung injury (VILI) promotes ischemia/reperfusion lung injury (I/R) and NF-kappaB antibody attenuates both injuries. *Resuscitation.* 2008 Oct;79(1):147-54.

13. Cypel M, Keshavjee S. Extracorporeal lung perfusion. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011 Aug 19.

14. Simoes EA, Pego-Fernandes PM, Cardoso PF, Pazetti R, Werebe E, de Oliveira Braga KA, et al. Comparing the performance of rat lungs preserved for 6 or 12 hours after perfusion with low-potassium dextran or histidine-tryptophan-ketoglutarate. *Transplant Proc.* 2011 Jun;43(5):1520-4.

15. Marasco SF, Bailey M, McGlade D, Snell G, Westall G, Oto T, et al. Effect of donor preservation solution and survival in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2011 Apr;30(4):414-9.

16. Kawamura T, Huang CS, Tochigi N, Lee S, Shigemura N, Billiar TR, et al. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplantation.* 2010 Dec 27;90(12):1344-51.

17. Andrade CF, Martins LK, Tonietto TA, Koefender C, Anflor LC, Jr., da Silva NB, et al. Partial liquid ventilation with perfluorodecalin following unilateral canine lung allotransplantation in non-heart-beating donors. *J Heart Lung Transplant.* 2004 Feb;23(2):242-51.

18. Pizanis N, Gillner S, Kamler M, de Groot H, Jakob H, Rauen U. Cold-induced injury to lung epithelial cells can be inhibited by iron chelators - implications for lung preservation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011 Mar 11.

19. Mayer E, Puskas JD, Cardoso PF, Shi S, Slutsky AS, Patterson GA. Reliable eighteen-hour lung preservation at 4 degrees and 10 degrees C by

- pulmonary artery flush after high-dose prostaglandin E1 administration. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Jun;103(6):1136-42.
20. Loehe F, Mueller C, Bittmann I, Messmer K, Schildberg FW. Influence of long-term preservation with endobronchially administered perfluorodecalin on pulmonary graft function. *Transplantation.* 2000 Nov 27;70(10):1417-24.
 21. Itano H, Aoe M, Ichiba S, Yamashita M, Date H, Andou A, et al. Partial liquid ventilation for acute allograft dysfunction after canine lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1999 Feb;67(2):332-9.
 22. Tuazon JG, Modell JH, Hood CI, Swenson EW. Pulmonary function after ventilation with fluorocarbon liquid (Caroxin-D). *Anesthesiology.* 1973 Feb;38(2):134-40.
 23. Gollan F, McDermott J, Johnson AE, Namon R. Compliance and diffusion during respiration with fluorocarbon fluid. *Fed Proc.* 1970 Sep-Oct;29(5):1725-30.
 24. Hosgood SA, Nicholson ML. The role of perfluorocarbon in organ preservation. *Transplantation.* 2010 May 27;89(10):1169-75.
 25. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest.* 1963 Feb;12:131-55.
 26. Sanchez PG, Martins LK, Martins FK, Schimer R, Cardoso PF, Andrade CF. Technical modification of unilateral lung transplantation in rats. *J Bras Pneumol.* 2007 Aug;33(4):448-53.
 27. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology.* 1978;52:302-10.
 28. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972 May 25;247(10):3170-5.
 29. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
 30. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
 31. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350-4.

32. Fujino Y, Goddon S, Chiche JD, Hromi J, Kacmarek RM. Partial liquid ventilation ventilates better than gas ventilation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Aug;162(2 Pt 1):650-7.
33. Hirschl RB, Tooley R, Parent A, Johnson K, Bartlett RH. Evaluation of gas exchange, pulmonary compliance, and lung injury during total and partial liquid ventilation in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1996 Jun;24(6):1001-8.
34. Torres RL, Belo-Klein A, Andrade CF, Cardoso PF. Effect of systemically administered low potassium dextran solution on oxidative stress in a rat model of lung ischemia. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2009 Jan;8(1):3-6.
35. Rotta AT, Gunnarsson B, Hernan LJ, Fuhrman BP, Steinhorn DM. Partial liquid ventilation with perflubron attenuates in vivo oxidative damage to proteins and lipids. *Crit Care Med.* 2000 Jan;28(1):202-8.
36. Quadri SM, Segall L, de Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, et al. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transplant.* 2005 Feb;5(2):292-9.
37. Shih HC, Huang MS, Lee CH. Magnolol Attenuates the Lung Injury in Hypertonic Saline Treatment from Mesenteric Ischemia Reperfusion through Diminishing iNOS. *J Surg Res.* 2011 May 25.
38. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95.
39. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424-37.
40. Yeh DY, Feng NH, Chen CF, Lin HI, Wang D. Inducible nitric oxide synthase expressions in different lung injury models and the protective effect of aminoguanidine. *Transplant Proc.* 2008 Sep;40(7):2178-81.
41. Shaw MJ, Shennib H, Bousette N, Ohlstein EH, Giaid A. Effect of endothelin receptor antagonist on lung allograft apoptosis and NOSII expression. *Ann Thorac Surg.* 2001 Aug;72(2):386-90.
42. Liu CC, Hsu PK, Huang WC, Huang MH, Hsu HS. Two-layer method (UW solution/perfluorochemical plus O₂) for lung preservation in rat lung transplantation. *Transplant Proc.* 2007 Dec;39(10):3019-23.

Figures

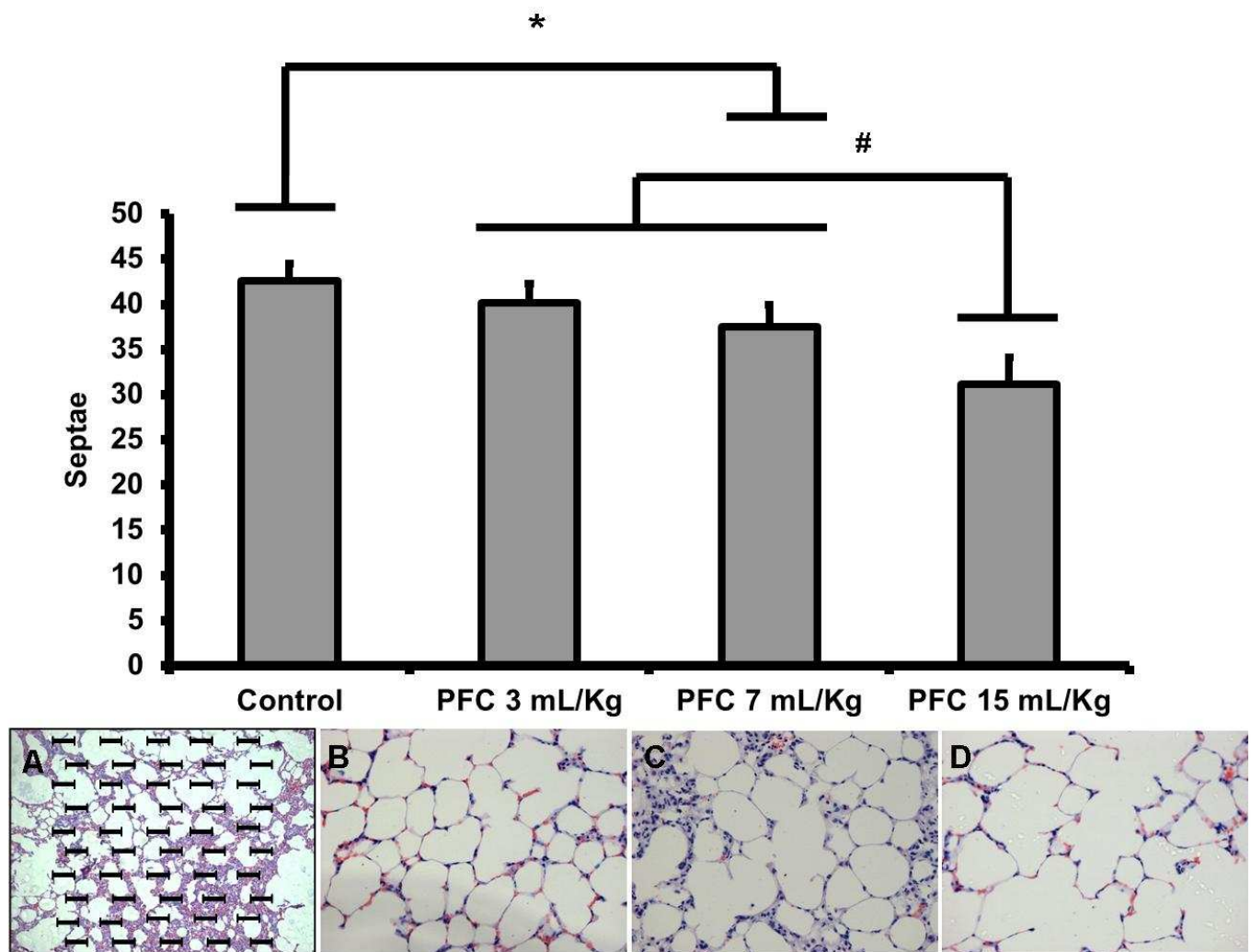


Figure 1 – Mean linear intercept analysis of lungs with three different doses of liquid perfluorocarbon. There was a significant decrease in crossed linear septae using a dose of PFC 7 ml/Kg (* $p < 0.05$) (C) when compared to controls (A). The dose of 15ml/Kg (D) showed a statistically significant reduction (# $p < 0.05$) of crossed septae compared to 3 (B) and 7 ml/Kg (C). Dizer quantos animais por grupos

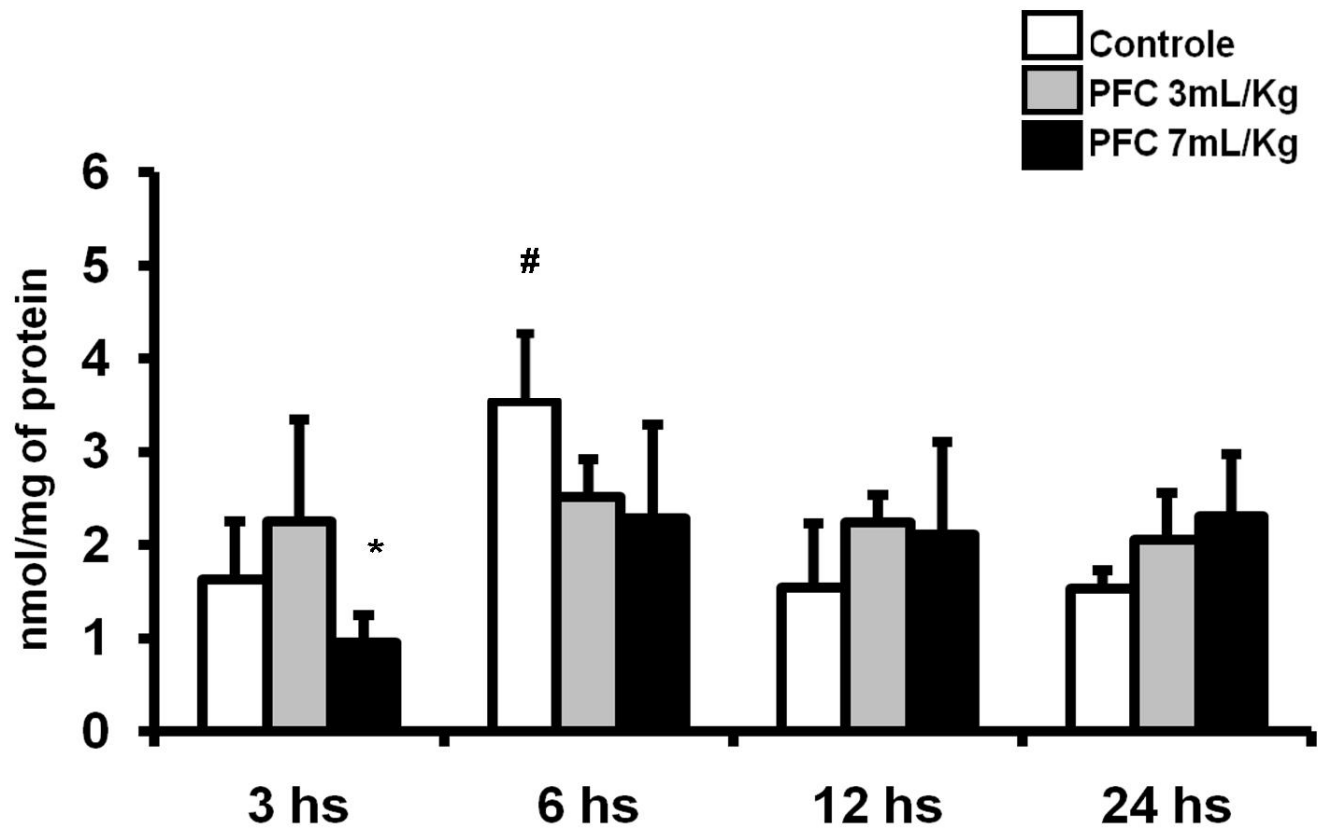


Figure 2 - Effects of different periods of lung preservation on pulmonary lipid peroxidation. Using the TBARS assay, there was a significant decrease in lipid peroxidation at 3 hours of preservation in group PFC 7ml/kg (* $p < 0.05$). Control group showed a significant increase in lipid peroxidation at 6hs (# $p < 0.05$). Data are mean \pm standard deviation of the mean. ($p > 0.05$).

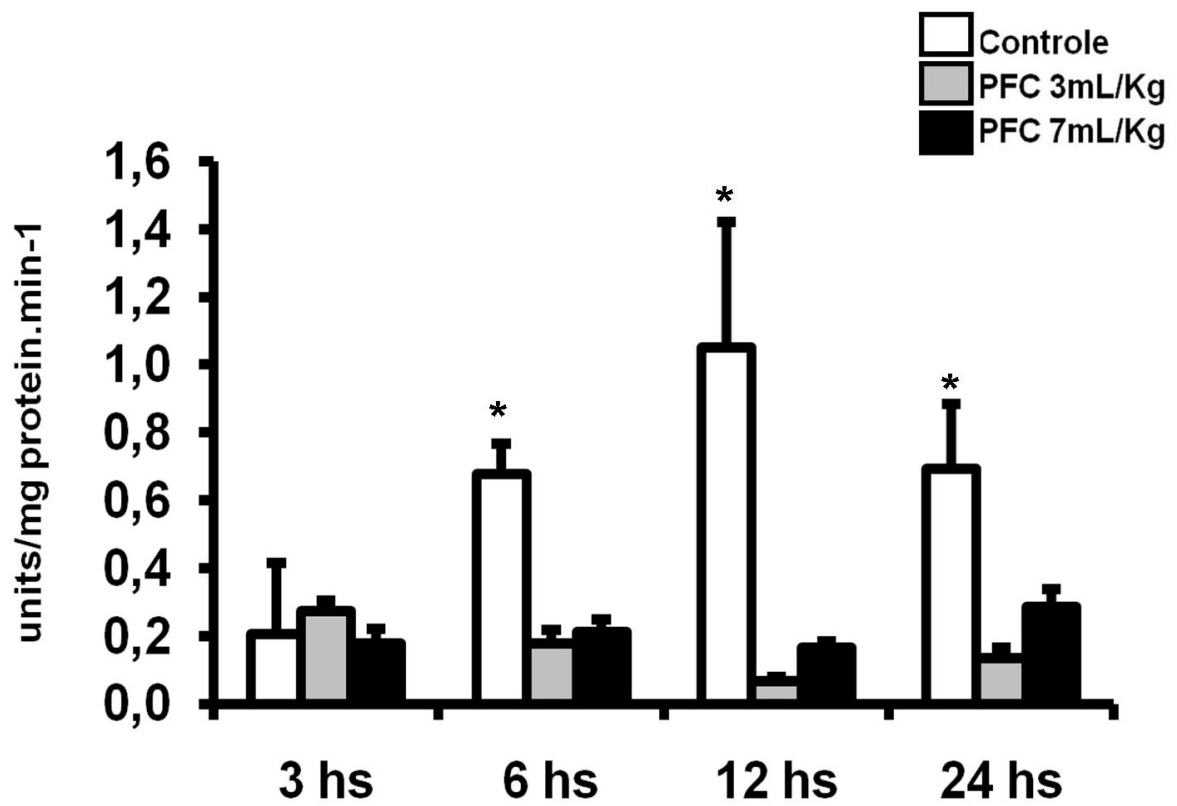


Figure 3 – Caspase 3 activity at different times of lung preservation. There is a significant increase of caspase 3 activity in the control group at 3, 6, 12 and 24 hours (* $p < 0.001$). Data are mean \pm standard deviation of the mean.

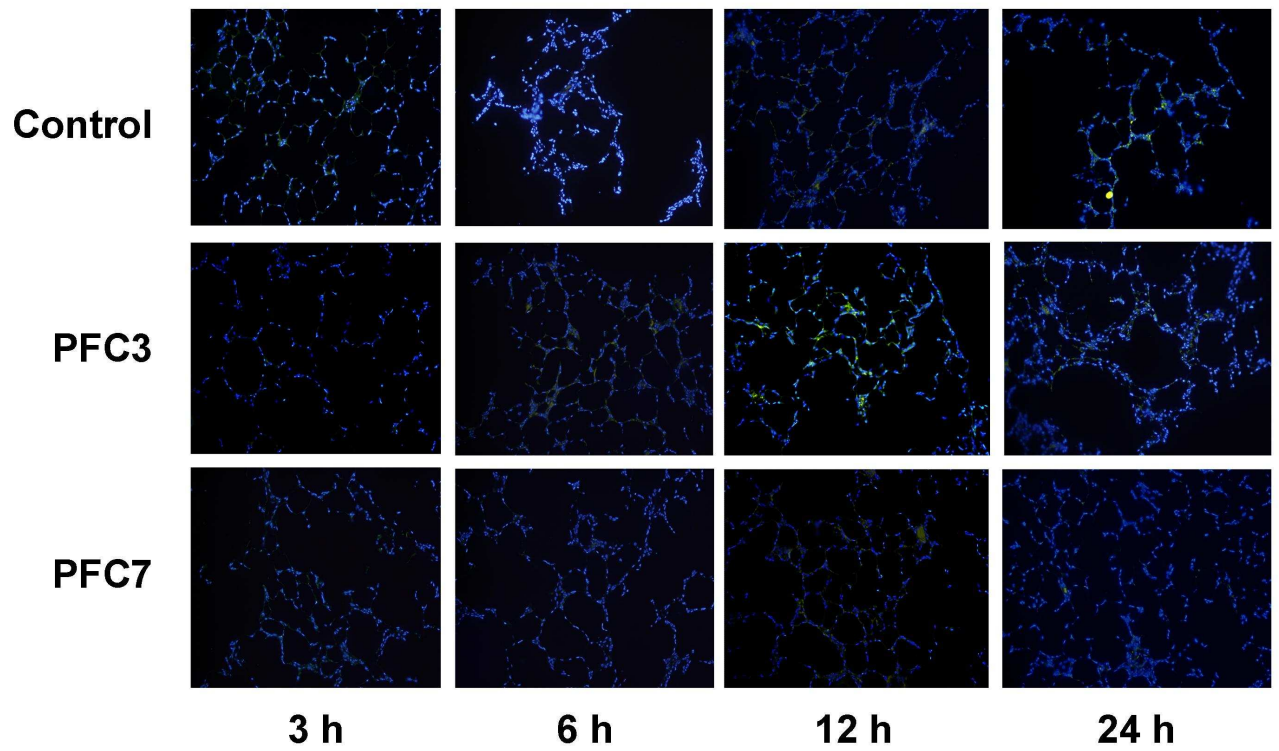


Figure 4 – TUNEL staining. DAPI and FITC staining: DAPI-positive cells (nucleated cells) are blue; FITC-positive cells (TUNEL-positive) are green. Note that almost all green areas in composite image in PFC 3 after 12 h of preservation.

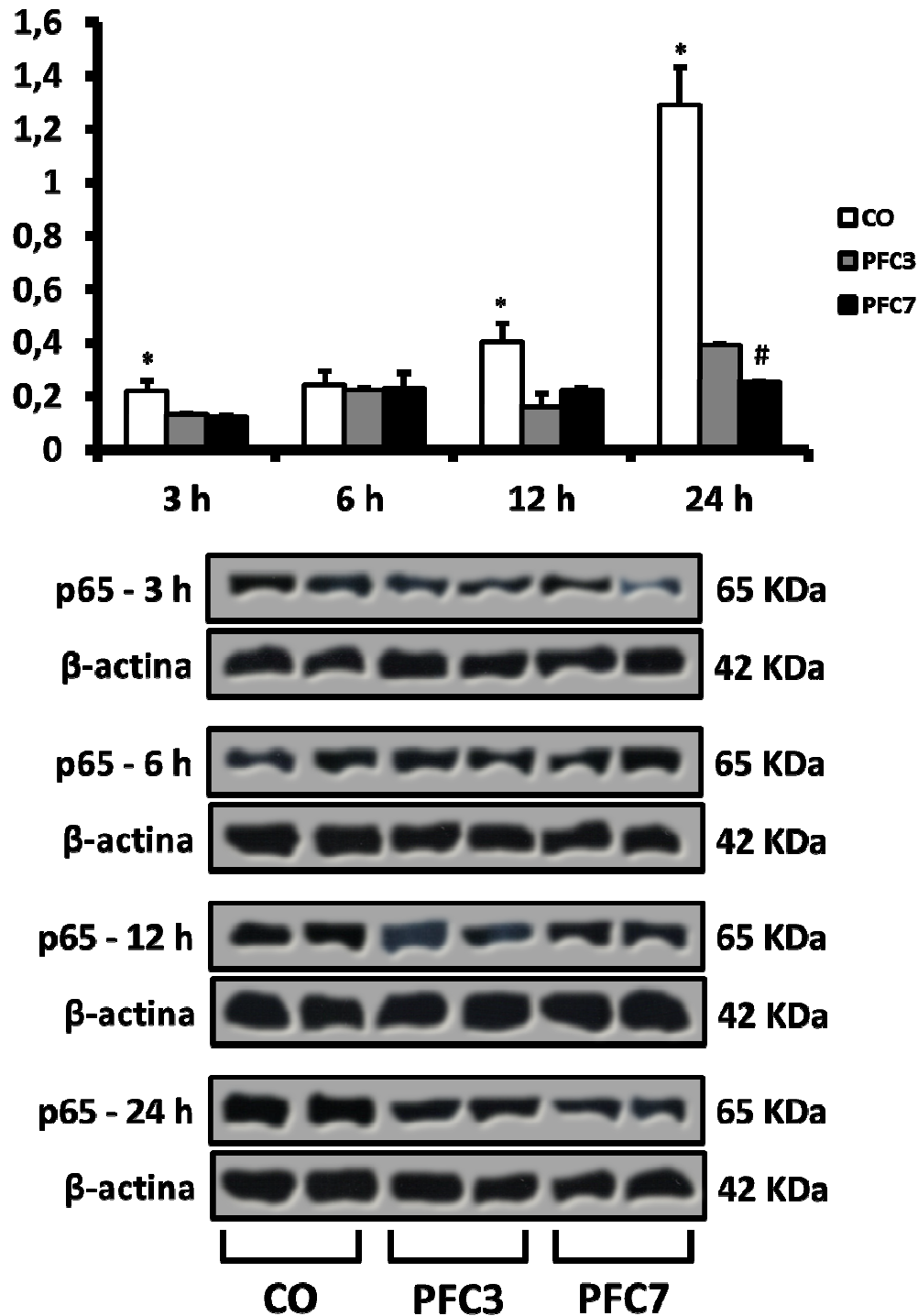


Figure 5 – NF- κ B expression (subunit p65) in lung tissue in different times of lung preservation. Observed a significant increase in the expression of p65 in the control group at 3, 12 and 24 hours compared to animals that used PFC (* $p < 0.05$). PFC7 reduces the expression of 24 hours of preservation when compared to PFC3 (# $p < 0.05$).

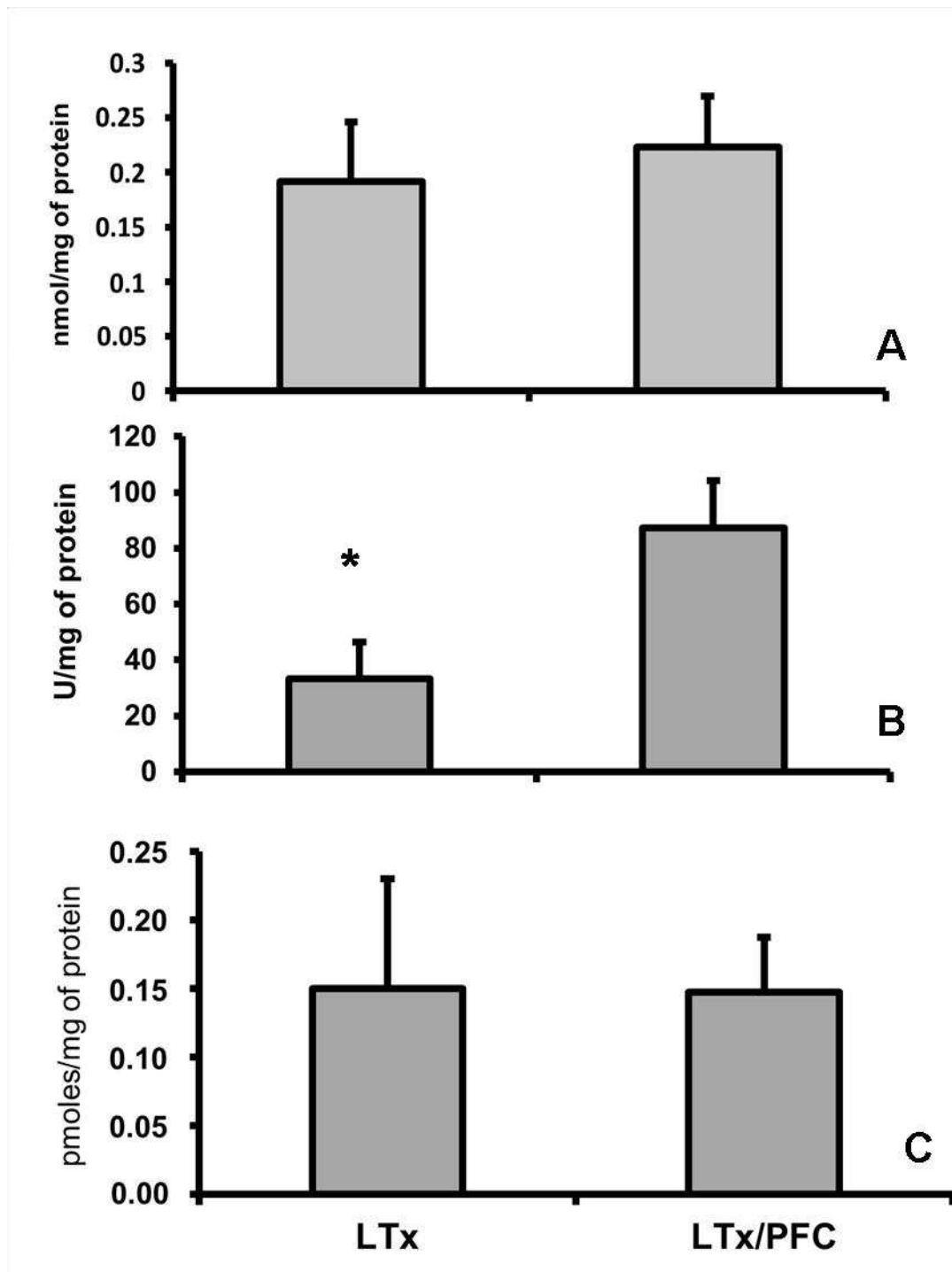


Figure 6 - Evaluation of oxidative stress and antioxidant enzymes. There was a significant increase in superoxide dismutase (SOD) activity in the LTx/PFC group when compared to the LTx group (* $p < 0.05$) (A); There was no significant difference on pulmonary lipid peroxidation, using TBARS assay (B) and antioxidant enzyme catalase (C).

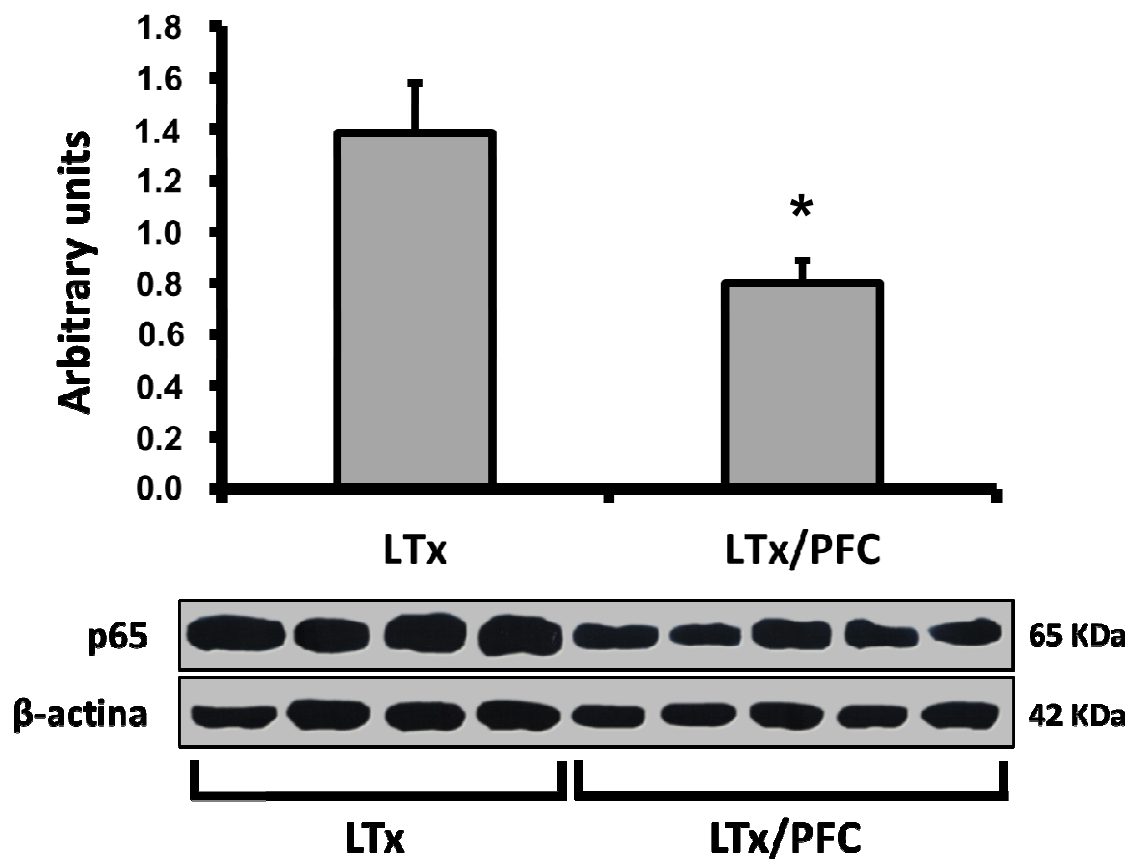


Figure 7 – Expression of NF- κ B (subunit p65) in lung tissue after transplantation. There was an increased expression of NF- κ B subunit p65 in the LTx group when compared to LTx/PFC group (* $p < 0.05$). The images are representative samples of groups.

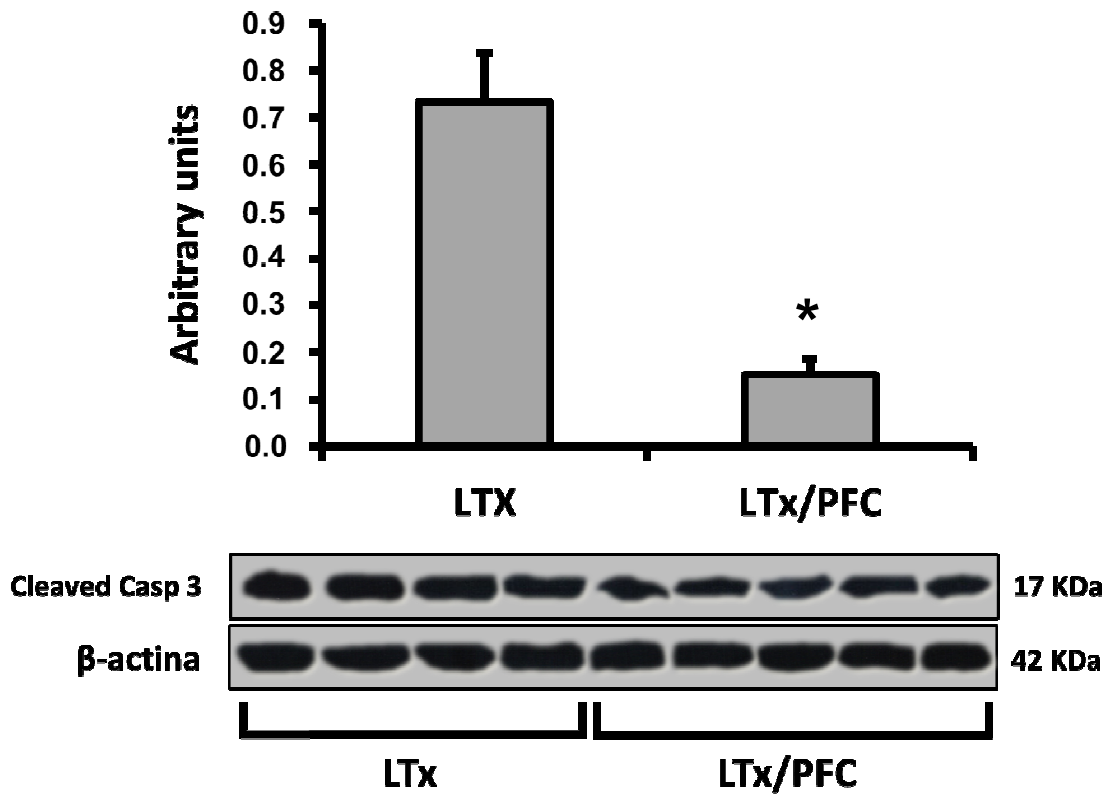


Figure 8 – Caspase 3 expression in lung tissue after transplantation. There was a significant reduction expression of caspase 3 LTx/PFC group (* $p < 0.05$) when compared with LTx group. The images are representative samples of groups.

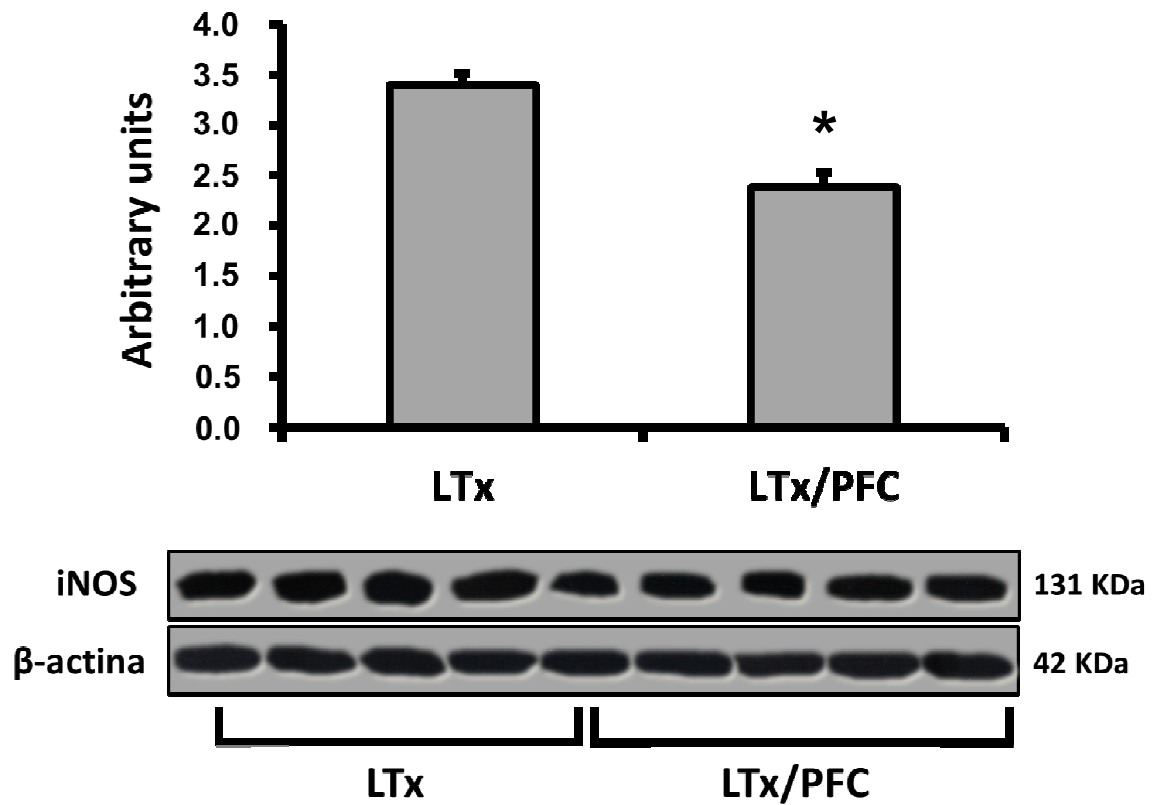


Figure 9 – Effect of lung transplantation on iNOS activity. iNOS activity was significantly higher in LTx group (* $p < 0.05$). These results indicate that LTx induced overexpression of iNOS and PFC treated group reduced iNOS expression. The images are representative samples of groups.

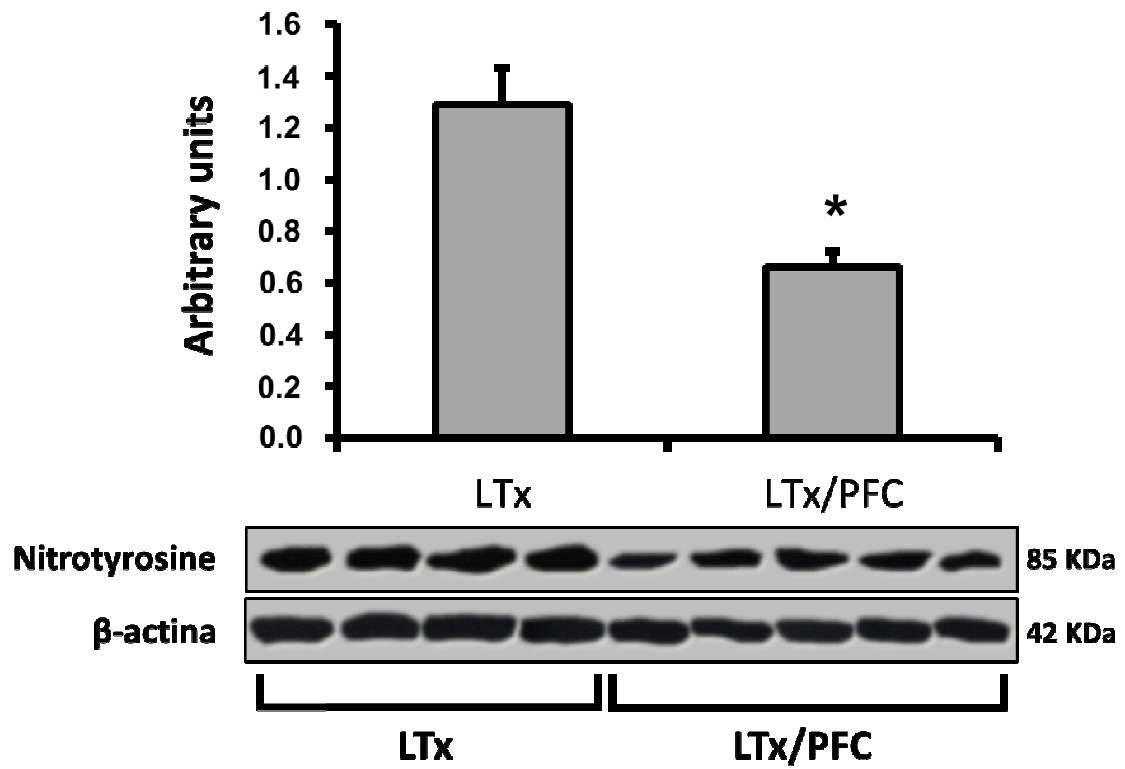


Figure 10 – Expression of Nitrotyrosine in lung tissue after transplantation. Nitrotyrosine expression was significantly lower in the LTx/PFC when compared with LTx group (* $p < 0.05$). The images are representative samples of groups.

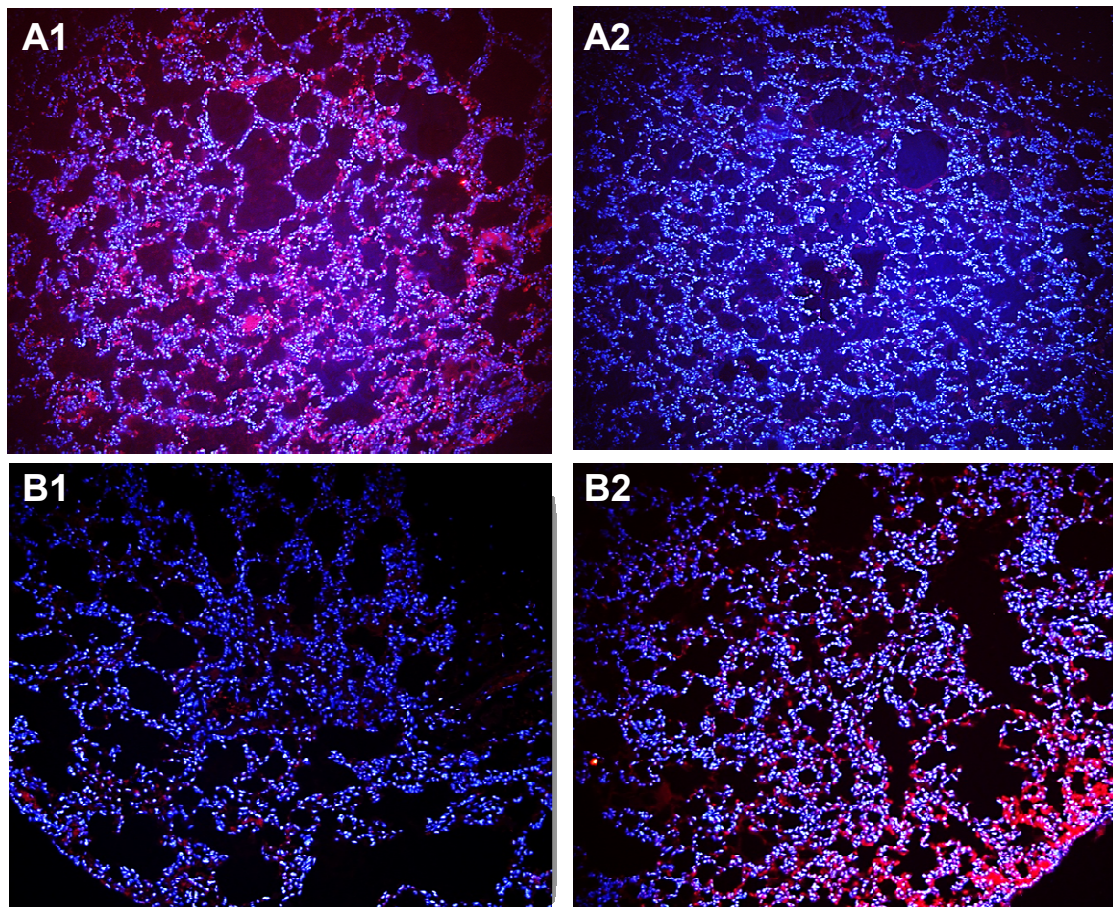


Figure 11 – Immunofluorescence staining of caspase 3 (A) and I κ B (B). CY3-positive cells (nucleated cells) are in red. There was an increased number of apoptotic cells by caspase 3 staining in LTx group (A1) and a inhibition of phosphorylation of the inhibitor I κ B in LTx/PFC group (B2). (A1 and B1 – LTx group; A2 and B2 – LTx/PFC group)

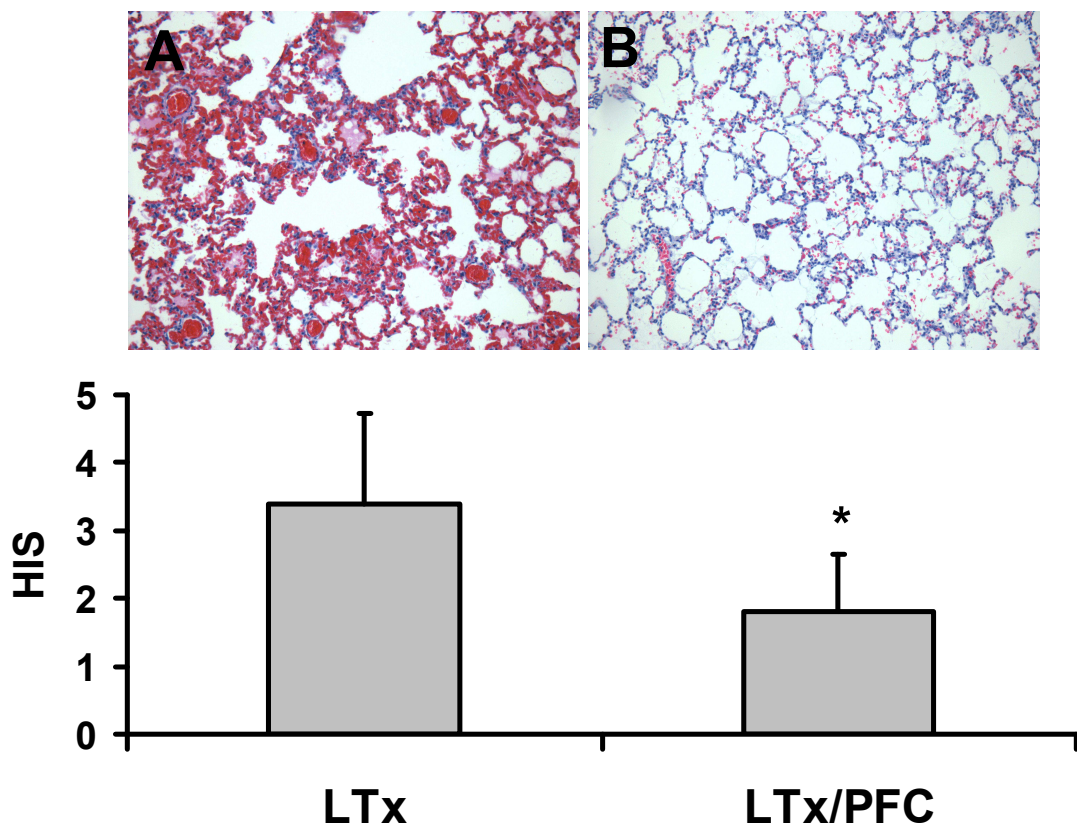


Figure 12 - Histological Score (HIS) after lung transplantation. Lung injury was characterized by perivascular edema, intra alveolar hemorrhage, interstitial, and intra alveolar leukocyte infiltration in the LTx group (**A**) compared to LTx/PFC group (**B**). HIS demonstrated significantly more lung injury in group LTx ($p < 0.05$) (x200 magnification).

References

1. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: eighteenth Official Report-2001. *J Heart Lung Transplant*. 2001 Aug;20(8):805-15.
2. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report-2009. *J Heart Lung Transplant*. 2009 Oct;28(10):1031-49.
3. Sommer SP, Sommer S, Sinha B, Wiedemann J, Otto C, Aleksic I, et al. Ischemia-reperfusion injury-induced pulmonary mitochondrial damage. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Jul;30(7):811-8.
4. Christie JD, Kotloff RM, Ahya VN, Tino G, Pochettino A, Gaughan C, et al. The effect of primary graft dysfunction on survival after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jun 1;171(11):1312-6.
5. Cypel M, Yeung JC, Keshavjee S. Novel approaches to expanding the lung donor pool: donation after cardiac death and ex vivo conditioning. *Clin Chest Med*. 2011 Jun;32(2):233-44.
6. Thabut G, Mal H, Cerrina J, Dartevielle P, Dromer C, Velly JF, et al. Graft ischemic time and outcome of lung transplantation: a multicenter analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Apr 1;171(7):786-91.
7. Kroegel C, Hekmat K, Moser A, Happe J, Walther R, Reissig A. [Airway complications following lung transplantation - clinic, diagnosis, and interventional management]. *Pneumologie*. 2011 May;65(5):293-307.
8. Ishiyama T, Dharmarajan S, Hayama M, Moriya H, Grapperhaus K, Patterson GA. Inhibition of nuclear factor kappaB by IkappaB superrepressor gene transfer ameliorates ischemia-reperfusion injury after experimental lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 Jul;130(1):194-201.
9. Torres RL, Martins LK, Picoral M, Auzani J, Fernandes TR, Torres IL, et al. The potential protective effect of low potassium dextran against lipid

peroxidation in a rat lung transplantation model. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2009 Aug;57(5):309-11.

10. Pilla ES, Vendrame GS, Sanchez PG, Grun G, Fontena E, Forgiarini LA, Jr., et al. Ischemic preconditioning by selective occlusion of the pulmonary artery in rats. *J Bras Pneumol*. 2008 Aug;34(8):583-9.

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

12. Chiang CH, Pai HI, Liu SL. Ventilator-induced lung injury (VILI) promotes ischemia/reperfusion lung injury (I/R) and NF-kappaB antibody attenuates both injuries. *Resuscitation*. 2008 Oct;79(1):147-54.

13. Cypel M, Keshavjee S. Extracorporeal lung perfusion. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Aug 19.

14. Simoes EA, Pego-Fernandes PM, Cardoso PF, Pazetti R, Werebe E, de Oliveira Braga KA, et al. Comparing the performance of rat lungs preserved for 6 or 12 hours after perfusion with low-potassium dextran or histidine-tryptophan-ketoglutarate. *Transplant Proc*. 2011 Jun;43(5):1520-4.

15. Marasco SF, Bailey M, McGlade D, Snell G, Westall G, Oto T, et al. Effect of donor preservation solution and survival in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Apr;30(4):414-9.

16. Kawamura T, Huang CS, Tochigi N, Lee S, Shigemura N, Billiar TR, et al. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplantation*. 2010 Dec 27;90(12):1344-51.

17. Andrade CF, Martins LK, Tonietto TA, Koefender C, Anflor LC, Jr., da Silva NB, et al. Partial liquid ventilation with perfluorodecalin following unilateral canine lung allotransplantation in non-heart-beating donors. *J Heart Lung Transplant*. 2004 Feb;23(2):242-51.

18. Pizanis N, Gillner S, Kamler M, de Groot H, Jakob H, Rauen U. Cold-induced injury to lung epithelial cells can be inhibited by iron chelators - implications for lung preservation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011 Mar 11.

19. Mayer E, Puskas JD, Cardoso PF, Shi S, Slutsky AS, Patterson GA. Reliable eighteen-hour lung preservation at 4 degrees and 10 degrees C by

pulmonary artery flush after high-dose prostaglandin E1 administration. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Jun;103(6):1136-42.

20. Loehe F, Mueller C, Bittmann I, Messmer K, Schildberg FW. Influence of long-term preservation with endobronchially administered perfluorodecalin on pulmonary graft function. *Transplantation.* 2000 Nov 27;70(10):1417-24.

21. Itano H, Aoe M, Ichiba S, Yamashita M, Date H, Andou A, et al. Partial liquid ventilation for acute allograft dysfunction after canine lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1999 Feb;67(2):332-9.

22. Tuazon JG, Modell JH, Hood CI, Swenson EW. Pulmonary function after ventilation with fluorocarbon liquid (Caroxin-D). *Anesthesiology.* 1973 Feb;38(2):134-40.

23. Gollan F, McDermott J, Johnson AE, Namon R. Compliance and diffusion during respiration with fluorocarbon fluid. *Fed Proc.* 1970 Sep-Oct;29(5):1725-30.

24. Hosgood SA, Nicholson ML. The role of perfluorocarbon in organ preservation. *Transplantation.* 2010 May 27;89(10):1169-75.

25. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest.* 1963 Feb;12:131-55.

26. Sanchez PG, Martins LK, Martins FK, Schimer R, Cardoso PF, Andrade CF. Technical modification of unilateral lung transplantation in rats. *J Bras Pneumol.* 2007 Aug;33(4):448-53.

27. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology.* 1978;52:302-10.

28. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972 May 25;247(10):3170-5.

29. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.

30. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

31. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350-4.

32. Fujino Y, Goddon S, Chiche JD, Hromi J, Kacmarek RM. Partial liquid ventilation ventilates better than gas ventilation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Aug;162(2 Pt 1):650-7.
33. Hirschl RB, Tooley R, Parent A, Johnson K, Bartlett RH. Evaluation of gas exchange, pulmonary compliance, and lung injury during total and partial liquid ventilation in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1996 Jun;24(6):1001-8.
34. Torres RL, Belo-Klein A, Andrade CF, Cardoso PF. Effect of systemically administered low potassium dextran solution on oxidative stress in a rat model of lung ischemia. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2009 Jan;8(1):3-6.
35. Rotta AT, Gunnarsson B, Hernan LJ, Fuhrman BP, Steinhorn DM. Partial liquid ventilation with perflubron attenuates in vivo oxidative damage to proteins and lipids. *Crit Care Med.* 2000 Jan;28(1):202-8.
36. Quadri SM, Segall L, de Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, et al. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transplant.* 2005 Feb;5(2):292-9.
37. Shih HC, Huang MS, Lee CH. Magnolol Attenuates the Lung Injury in Hypertonic Saline Treatment from Mesenteric Ischemia Reperfusion through Diminishing iNOS. *J Surg Res.* 2011 May 25.
38. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95.
39. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424-37.
40. Yeh DY, Feng NH, Chen CF, Lin HI, Wang D. Inducible nitric oxide synthase expressions in different lung injury models and the protective effect of aminoguanidine. *Transplant Proc.* 2008 Sep;40(7):2178-81.
41. Shaw MJ, Shennib H, Bousette N, Ohlstein EH, Giaid A. Effect of endothelin receptor antagonist on lung allograft apoptosis and NOSII expression. *Ann Thorac Surg.* 2001 Aug;72(2):386-90.
42. Liu CC, Hsu PK, Huang WC, Huang MH, Hsu HS. Two-layer method (UW solution/perfluorochemical plus O₂) for lung preservation in rat lung transplantation. *Transplant Proc.* 2007 Dec;39(10):3019-23.

9. Conclusão

Verificamos que a administração endobrônquica de perfluorcarbono líquido fornece proteção adicional aos pulmões quando estudados nas diferentes fases do transplante pulmonar.

A administração do perfluorcarbono líquido mostrou-se possível em modelo de isquemia e reperfusão pulmonar reduzindo a resposta inflamatória e presença de células apoptóticas além de proteger os pulmões do estresse oxidativo pós reperfusão.

A dose ideal de perfluorcarbono escolhida para preservação pulmonar foi de 7ml/kg, devido a uma redução significativa da atividade inflamatória e número de células apoptóticas em pulmões submetidos a 12 e 24 horas de isquemia fria.

O perfluorcarbono quando utilizado em pulmões armazenados por 12 horas em temperatura de 4°C e posteriormente transplantados, melhorou a viabilidade e o desempenho dos enxertos pulmonares, reduzindo a lesão de reperfusão pós-transplante.

10. Considerações Finais

Para testar a influência do perfluorocarbono líquido instilado via endobrônquica na lesão de isquemia e reperfusão pulmonar, primeiramente tivemos de estabelecer qual o tempo ideal de isquemia onde provavelmente o PFC poderia auxiliar na proteção pulmonar. Este tempo de isquemia não deveria ser longo o bastante no qual não pudesse ser reversível e nem tão curto onde não poderíamos verificar a sua efetividade. Por isto, em um modelo experimental de isquemia-reperfusão pulmonar por clampeamento da artéria pulmonar, estabelecemos o tempo de 45 minutos de isquemia como o tempo ideal para o nosso estudo com PFC. Neste período de isquemia havia o maior número de células apoptóticas e poucas células necróticas. Utilizando este modelo, mostramos que o uso de PFC contribuiu para redução da atividade inflamatória e proteção do pulmão contra os efeitos danosos da lesão de reperfusão.

Posteriormente, mostramos pela primeira vez na literatura que o perfluorocarbono pode ser utilizado como uma substância auxiliar na preservação de pulmões para transplante, mantendo a viabilidade celular e reduzindo sua atividade inflamatória por tempos mais prolongados de isquemia fria. Estes achados foram confirmados após o transplante, onde houve uma significativa superioridade dos pulmões preservados com PFC tanto a nível molecular como histológico quando comparados com a preservação pulmonar convencional. Este trabalho forneceu importantes informações sobre a potencial utilização do perfluorocarbono como um potencial adjuvante para a preservação pulmonar e provavelmente impulsionará novos estudos para testar

sua aplicabilidade em modelos animais de grande porte e futuramente em estudos clínicos.