

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

IMPACTO DO *FLUSH* VASCULAR PULMONAR E DA
PRESERVAÇÃO A FRIO NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E
NO DIÂMETRO ALVEOLAR MÉDIO DE PULMÕES DE RATOS

RODRIGO STORCK CARVALHO

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO TAVARES

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. CÉSAR AUGUSTO MELO E SILVA

BRASÍLIA – 2009

RODRIGO STORCK CARVALHO

IMPACTO DO *FLUSH* VASCULAR PULMONAR E
PRESERVAÇÃO A FRIO NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS
PULMONARES E NO DIÂMETRO ALVEOLAR MÉDIO

Dissertação entregue ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Médicas da
Faculdade de Medicina da Universidade
de Brasília – UnB, como requisito par-
cial para a obtenção do título de Mestre.

BRASÍLIA – 2009

Epígrafe

$$P(S, t) = Ke^{-r(T-t)}N(-d_2) - SN(-d_1)$$

$$\delta = N(d_1)$$

$$\gamma = \frac{N'(d_1)}{S\sigma\sqrt{T-t}}$$

$$\nu = SN'(d_1)\sqrt{T-t}$$

$$\theta = -\frac{SN'(d_1)\sigma}{2\sqrt{T-t}} - rKe^{-r(T-t)}N(d_2)$$

$$\rho = K(T-t)e^{-r(T-t)}N(d_2)$$

Fischer Black and Myron Scholes

Dedicatória

A meus pais, Bayard Garcia Carvalho e Maria de Fátima Storck Carvalho, e ao meu irmão Bruno Storck Carvalho.

Agradecimentos

Algumas pessoas contribuíram de forma significativa para a elaboração e realização dessa dissertação. A elas manifesto meu sincero agradecimento:

- Ao Prof. Dr. Paulo Tavares, meu orientador, pela oportunidade e incentivo dado desde o dia em que eu o conheci. A cada encontro um novo aprendizado eu tive, de função pulmonar a relacionamentos. Muito grato por tudo Dr. paulo.;
- Ao Prof. Dr. César Augusto Melo e Silva por manter constante o estímulo a prática da boa pesquisa científica e por todas as oportunidades proporcionadas (algumas salvadoras da pátria...) nestes quase 10 anos de amizade e parceria de sucesso. Muito grato grande Mestre!;
- Ao Prof. Dr. Eduardo Gaio por manter as portas do laboratório abertas a qualquer tempo e pela força dada nas etapas deste trabalho;
- A Profa. Dra. Verônica Amado por manter as portas do laboratório abertas a qualquer tempo;
- Ao Prof. Dr. Rodolfo pelo auxílio na análise morfométrica deste trabalho;
- Aos meus sócios e amigos Prof. Dr. Sérgio Leite e Profa. MSc. Fernanda Ribeiro;
- Ao Ronaldo, pela presença bem humorada em todos os momentos no laboratório;
- Aos meus pais, Bayard Garcia Carvalho e Maria de Fátima Storck Carvalho, por todo amor com que conduzem nossa família, e por acreditarem

mais uma vez na formação acadêmica como coadjuvante da minha formação humana. Amo vocês!;

- Ao Bruno Storck Carvalho, meu irmão, pela amizade e amor. Amo você!;
- A Mônica Mendes Vieira, pelo amor, paciência, dedicação e colaboração... Amo você.;
- A Rosane, minha psicóloga, pela ajuda nos momentos em que a solução parecia não existir;

Resumo

Introdução: As condições mecânicas e o arranjo arquitetural dos pulmões desempenham importante papel na gênese de lesões pulmonares. Estas condições dependem da hemodinâmica pulmonar que, assim como fatores estruturais, estão alterados durante a preservação dos pulmões. O objetivo deste trabalho foi estudar o impacto do *flush* vascular pulmonar e da isquemia fria, bem como das estratégias de recrutamento alveolar, nas propriedades mecânicas e na arquitetura alveolar de pulmões de ratos. Material e métodos: 40 ratos da raça Wistar foram divididos em 5 grupos: (i) CTRL, pulmões isolados submetidos apenas a, aproximadamente, 20 minutos de isquemia em ar ambiente; (ii) *Flush*, pulmões isolados submetidos ao *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins a 4 °C e à 20 minutos de isquemia em ar ambiente; (iii) ISQ, pulmões isolados submetidos ao *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins a 4 °C e preservados por 10 horas a 4 °C (isquemia fria); (iv) CPT, pulmões isolados submetidos ao *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins a 4 °C, preservados por 10 horas a 4 °C e recrutados à capacidade pulmonar total (CPT) por 2 minutos; (v) VC, pulmões isolados submetidos ao *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins a 4 °C, preservados por 10 horas a 4 °C e ventilados com volume corrente de 3 mL, frequência respiratória de 45 irpm e pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 5 cmH₂O durante 10 minutos. Para o estudo das propriedades mecânicas pulmonares foi utilizado o modelo reológico bicompartimental e o método de oclusão rápida ao final da inspiração. Para calcular o diâmetro alveolar médio, a análise morfométrica foi feita em 15 campos aleatórios de cada lâmina em um aumento de 400X. Resultados: O *flush* vascular pulmonar e a isquemia fria aumentaram significativamente a dissipação de energia no componente viscoelástico pulmonar, bem como a elastância. No entanto, as estratégias de re-

crutamento diminuíram significativamente a dissipação de energia no componente viscoelástico e a elastância nos pulmões submetidos ao *flush* vascular pulmonar e isquemia fria. O diâmetro alveolar médio aumentou significativamente nos pulmões submetidos ao *flush* vascular pulmonar e isquemia fria, bem como foi reduzido de forma significativa nos pulmões submetidos às estratégias de recrutamento. Conclusão: A elastância e a dissipação de energia no componente viscoelástico pulmonar aumentam significativamente nos pulmões submetidos ao *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins, e a utilização das estratégias de recrutamento antes das medidas preservam os pulmões de um mau desempenho mecânico e trazem o diâmetro alveolar médio para valores próximos aos do grupo CTRL.

Palavras-chave: Euro-Collins; recrutamento alveolar; morfometria alveolar; mecânica ventilatória.

Abstract

Rationale: The pulmonary mechanical conditions and architectural arrangement of the lungs play important role in the genesis of lung injury. These conditions depend on the pulmonary hemodynamics that, as well as structural factors are changed during lung preservation. The goal of this study is to investigate the impact of pulmonary vascular flush, cold ischemia and alveolar recruitment strategies in mechanical properties and alveolar architecture of rats lungs.

Methods: 40 Wistar rats were randomly divided into 5 groups: (i) CTRL, isolated lungs with only about 20 minutes of ischemia in room air, (ii) Flush, isolated lungs with pulmonary vascular flush with preservation Euro-Collins solution at 4° C and 20 minutes of ischemia in room air, (iii) ISQ, isolated lungs with pulmonary vascular flush with preservation Euro-Collins solution at 4° C for 10 hours, (iv) TLC, isolated lungs with pulmonary vascular flush with preservation Euro-Collins solution at 4° C for 10 hours and recruited to the total lung capacity (TLC) for 2 minutes, (v) VC, isolated lungs with pulmonary vascular flush with preservation Euro-Collins solution at 4° C for 10 hours and ventilated with tidal volume of 3 mL, respiratory rate of 45 bpm and positive end expiratory pressure (PEEP) of 5 cmH₂O for 10 minutes. For the mechanical properties of lung a rheological bicompartimental model was used and the end inflation occlusion method performed to get variables. To calculate alveolar diameter, a morphometric analysis was performed on 15 random fields of each slide in an increase of 400X.

Results: The pulmonary vascular flush and cold ischemia increased significantly the energy dissipation in the viscoelastic component of lung, as well the elastance. However, the recruitment strategies decreased significantly the energy dissipation in the viscoelastic component and lung elastance in the lungs with pulmonary vascular flush and cold ischemia. The alveolar diameter increased significantly in lungs with pulmonary vascular flush and cold ischemia and was reduced signifi-

cantly in those with recruitment strategies. Conclusion: The elastance and energy dissipation in the viscoelastic component significantly increased in lungs with pulmonary vascular flush with preservation Euro-Collins solution, and recruitment strategies use before measures save lungs of a poor mechanical performance and bring the alveolar diameter closer to the CTRL group values.

Keywords: Euro-Collins, alveolar recruitment, alveolar morphometry; ventilatory mechanics.

Sumário

Epígrafe	ii
Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	viii
Lista de Figuras	xii
1 Introdução	1
2 Objetivos	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3 Material e métodos	10
3.1 Animais utilizados	10
3.2 Caracterização dos grupos	10
3.3 Extração dos blocos coração-pulmões	11
3.4 <i>Flush</i> Vascular Pulmonar	12
3.5 Medida das propriedades mecânicas dos pulmões	13
3.6 Aquisição dos sinais	15
3.7 Fixação dos pulmões e preparação das lâminas	16
3.8 Análise morfométrica	17
3.9 Análise estatística	17

4 Resultados	19
5 Discussão	24
6 Conclusão	28
Referências Bibliográficas	29

Lista de Figuras

1	Modelo linear unicompartimental	5
2	Modelo linear bicompartimental de Mount	7
3	Modelo linear bicompartimental de Mount	13
4	Fluxo aéreo	21
5	Volume pulmonar	21
6	$\Delta P1$	22
7	$\Delta P2$	22
8	E_{st}	23
9	Diâmetro alveolar médio	23

1 Introdução

Adultos e crianças com doença pulmonar em estágio terminal podem, hoje, ter suas vidas prolongadas por meio de transplante pulmonar, uma realidade.¹ Aspectos evoluíram no campo do transplante pulmonar e a sobrevida em 1 ano aumentou de 74% para 81%, e a sobrevida em 5 anos aumentou de 47% para 54%.² Muito embora avanços tenham surgidos no campo técnico do transplante pulmonar, nos últimos anos não tem havido aumento na sobrevida de longo prazo. Segundo a Sociedade Internacional de Transplante de Coração e Pulmões, a sobrevida em 10 anos é de, aproximadamente, 28%.²

Apesar de serem conhecidas informações significantes acerca da condição funcional dos indivíduos com sobrevida de 5 anos, poucos estudos trazem informações acerca das condições clínica e funcional de indivíduos com sobrevida maior que 5 anos.³ No entanto, aspectos importantes envolvidos nos transplantes têm sido abordados em estudos experimentais, como os danos arquiteturais decorrentes da isquemia e posterior reperfusão do tecido pulmonar no decurso do procedimento de reimplante do enxerto.⁴ Como dito, avanços surgiram e esta área tem sido o propósito de pesquisas nos últimos tempos no entanto, permanece desconhecida a maneira mais adequada para preservação do enxerto, e os danos estruturais com conseqüente alterações funcionais decorrentes da lesão de isquemia e reperfusão predominam como principal causa de morbidade e mortalidade na fase inicial do transplante.⁴

Com os métodos e técnicas atuais de preservação, a viabilidade do enxerto em isquemia fria permanece em torno de 6 a 9 horas, fato este que res-

tringe a realização do transplante, e tira desta cirurgia o caráter eletivo. Esforços continuam sendo dispendidos na tentativa do prolongamento da viabilidade do enxerto em isquemia fria. No entanto, as tentativas de prolongamento do tempo em isquemia fria parecem desencadear uma cascata de eventos lesivos que resultam em falência do enxerto.⁵

O entendimento das potenciais causas de rejeição e posterior falência do enxerto pulmonar começaram a ser elucidadas na década de cinquenta do século passado, quando Peter Medewar criou uma fundação para o desenvolvimento de transplante de órgãos.⁶ A partir de então, avanços nas técnicas para transplantes surgiram e passaram a viabilizar a realização dos procedimentos, especialmente pelo aprimoramento nas técnicas de preservação dos enxerto. A preservação dos pulmões, na atualidade, começa por substituição do sangue presente na vasculatura pulmonar por uma solução de preservação em temperatura baixa, 4 °C, com posterior armazenamento a frio até o momento do reimplante. Tal procedimento tem por finalidade uniformizar o resfriamento do tecido pulmonar, bem como retirar da vasculatura pulmonar os elementos do sangue de modo a evitar possível formação de trombos e lesão celular.⁷

Dois são os tipos de solução de preservação, as intracelulares (Euro-Collins) e as extracelulares (*Low-Potassium Dextran* – LPD). As primeiras são caracterizadas pela alta concentração de potássio (K^+) e baixa concentração de sódio (Na^+) e cloro (Cl^-), e sua utilização, segundo Ware *et al*⁷ em 1999 e Sugita *et al*⁸ no mesmo ano, é justificada pelo fato de haver inativação da bomba de sódio-potássio durante a preservação do enxerto em ambiente hipotérmico. Ora, se uma solução com características análogas à do meio intracelular estiver

presente no leito vascular, bem como no espaço extracelular, o influxo de água e Na^+ ficará atenuado, de modo a poupar as células de um aumento em seu volume. Em contrapartida, a resistência vascular pulmonar, possivelmente, aumentará no momento em que a circulação for restabelecida, pois nesta solução do tipo intracelular está contido um potente agente vasoconstrictor, o K^+ .⁹ Já as soluções do tipo extracelular são caracterizadas pela concentração de Na^+ , K^+ e Cl^- similares à do meio extracelular, e pela adição de dextran 40, uma substância capaz de conservar a pressão oncótica no capilar pulmonar e conservar a água no espaço intravascular, de modo a evitar edema celular.¹⁰

Muito embora o tecido pulmonar sofra danos quando submetido à baixas temperaturas,⁵ o procedimento de armazenamento do enxerto em ambiente hipotérmico é condição indispensável para viabilizar sua preservação. O que se justifica pela diminuição do metabolismo celular, que conseqüentemente reduz a velocidade das reações bioquímicas no tecido pulmonar, mantendo-o, dessa forma, viável, ainda que em isquemia.⁹

Muitos são os estudos que relacionam a lesão pulmonar de isquemia e reperfusão com as respostas inflamatórias, bioquímicas, humorais,^{9,11,12} inativação da bomba de sódio e potássio,^{7,8} e apoptose. No entanto, eventos relacionados à mecânica pulmonar também estão envolvidos na gênese da lesão de isquemia e reperfusão. Dessa forma tem sido atribuída à lesão de isquemia e reperfusão a principal causa de falência do enxerto pulmonar.⁴

É sabido que os pulmões são órgãos dotados de estrutura fisiológica e anatômica ímpares, o que chama atenção para os fatores, especialmente os mecânicos, determinantes do seu bom funcionamento ou da gênese da lesão de

isquemia e reperfusão. São eles: (i) volume pulmonar no período de preservação em isquemia fria,¹³⁻¹⁶ (ii) taxa de fluxo de reperfusão¹⁷⁻¹⁹ e (iii) diâmetro da vasculatura pulmonar.²⁰ O fator hemodinâmico é um dos responsáveis pela estabilidade mecânica do parênquima pulmonar.^{21,22} Condições hemodinâmicas que alterem a pressão transmural são capazes de interferir no desempenho mecânico dos pulmões. Peták e cols em 2004²³ mostraram que a hipoperfusão contribui com a instabilidade mecânica dos pulmões, pois aumenta a elastância e a resistência dos tecidos pulmonares, no entanto, voltam a diminuir no momento em que a perfusão é restabelecida. Esta instabilidade mecânica dos pulmões se justifica pela alteração da pressão capilar. Assim como a hipoperfusão, a congestão vascular pulmonar²¹ também contribui com a instabilidade mecânica pulmonar.

Datam da década de 1960 observações feitas por Borst e colaboradores²⁴ sobre o impacto do sangue nas propriedades mecânicas dos pulmões, quando verificaram que o aumento da pressão atrial esquerda diminuía a complacência pulmonar. Da mesma forma, em 1978, Gray e colaboradores²⁵ mostraram em cães que o aumento da pressão arterial pulmonar (decorrente de aumento do volume sanguíneo pulmonar provocado por oclusão parcial da válvula mitral) também cursava com diminuição da complacência pulmonar. Outrossim, a diminuição do volume sanguíneo no leito vascular pulmonar repercute com diminuição da superfície alveolar.²⁶ Outra evidência da influência do volume sanguíneo pulmonar nas propriedades mecânicas pulmonares foi mostrada por Simon e colaboradores²⁷ em 1997 quando ocluíram um ramo da artéria pulmonar e verificaram aumento da elastância pulmonar ipsilateral a oclusão, e

aumento do volume ventilatório no pulmão contralateral a oclusão, o que os fizeram concluir que o volume pulmonar também depende do volume sanguíneo no leito vascular pulmonar.

Como ilustrado na Figura 1, uma resistência (representada por um amortecedor) e uma elasticidade (representada por uma mola) compõem o modelo mecânico análogo que mais simplesmente representa o sistema respiratório. Deste modelo deriva a conhecida equação do movimento do sistema respiratório, que é dada por: $P_{(t)} = R\dot{V}_{(t)} + EV_{(t)}$, onde P representa a pressão de abertura das vias aéreas, R representa a resistência do sistema respiratório e E representa a elastância do sistema respiratório. V é o volume, \dot{V} é o fluxo aéreo e o t representa unidade de tempo. Este modelo linear unicompartimental assume que a resistência e a elastância são independentes do fluxo e do volume, respectivamente, e considera desprezíveis as forças inerciais.²⁸

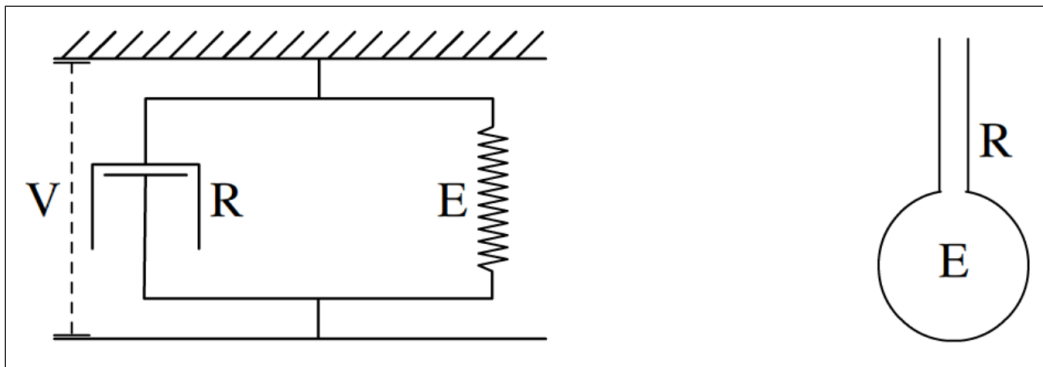


Figura 1: Modelo linear unicompartimental. Representação mecânica e anatômica.

Quando uma força é aplicada neste sistema a barra móvel se movimentará (gera volume), fazendo trabalhar a mola e o amortecedor que estão ligados em paralelo. Muito embora este modelo permita a mensuração da resistência e da elastância, ele não é capaz de explicar alguns fenômenos mecânicos existentes no sistema respiratório, como (i) a histerese na curva volume-pressão e (ii) a

queda lenta observada após uma oclusão rápida ao final da inspiração.²⁹ Dessa forma modelos bicompartimentais são necessários para explicar tais fenômenos, modelos em que os compartimentos possam ter constantes de tempo diferentes, assim representando mais fielmente as propriedades mecânicas do sistema respiratório. Os primeiros modelos bicompartimentais surgiram na década de 60, demonstrados por Mount,³⁰ Otis e colaboradores³¹ e Mead³² para estudo da mecânica do sistema respiratório.

Mas foi em 1985 que Bates e colaboradores,²⁹ ao reunirem as informações produzidas Otis e colaboradores,³¹ Mount³⁰ e Zin e colaboradores,³³ apresentaram o modelo proposto por Mount³⁰ (modelo reológico bicompartimental reológico, figura 2) composto por elementos elásticos e resistivos, representados por molas e amortecedores, respectivamente. Com modelo, é possível realizar um estudo teórico das propriedades mecânicas do sistema respiratório. Quando ventilado mecanicamente com fluxo inspiratório constante e volume controlado e submetido a oclusão rápida das vias aéreas ao final da inspiração, observa-se, no traçado de pressão em função do tempo, uma queda rápida de pressão ($\Delta P1$) de um ponto máximo ($P_{m\acute{a}x}$) até um ponto de inflexão (P_i), seguida de uma queda lenta ($\Delta P2$) até o ponto em que seja atingido o platô pressórico (P_{el}). A queda rápida representa a dissipação de energia para vencer as resistências newtonianas das vias aéreas e dos pulmões, a queda lenta representa a dissipação de energia nos componente viscoelásticos e inomogeneidades dos tecidos pulmonares, e o platô representa a pressão de retração elástica pulmonar (P_{el}).

Sustentado pela premissa deste modelo, a queda rápida de pressão re-

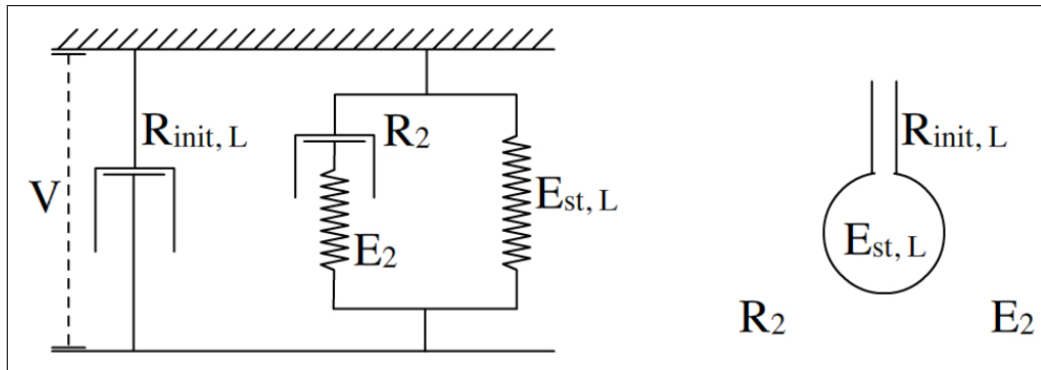


Figura 2: Modelo linear bicompartimental de Mount. Representação mecânica e anatômica.

sultante da oclusão rápida das vias aéreas ao final da inspiração pode ser explicada pela característica do componente viscoso ou homogêneo do sistema respiratório, a ausência de desigualdades da constante de tempo. Já a queda lenta observada na sequência da oclusão das vias aéreas, pode ser explicada pelas características do componente viscoelástico e inhomogeneidade do sistema respiratório, o *stress relaxation* e *pendelluft*.^{29,34} O *stress relaxation* é a propriedade que o tecido pulmonar tem de se adaptar a um estiramento mantido, mostrando queda da tensão tecidual em função do tempo. Uma vez que os pulmões são insuflados e, em seguida, há oclusão rápida das vias aéreas, o volume insuflado é mantido aprisionado nos pulmões. No entanto, a pressão gerada por este volume cai progressivamente até que ocorra um equilíbrio na relação comprimento-tensão. Já o *pendelluft* é a redistribuição regional de pequenos volumes de gás de áreas de maior pressão para áreas de menor pressão, explicadas pelas diferentes constantes de tempo.

A compreensão de que o bom arranjo mecânico pulmonar depende dos fatores supracitados nos facilita o entendimento de que pulmões mecanicamente inhomogêneos estão mais susceptíveis à lesão de isquemia e reperfusão. O simples fato de substituir o sangue por solução de preservação Euro-Collins já tornam

os pulmões mecanicamente instáveis.³⁵ No entanto, precisamos saber se protocolos de recrutamento alveolar até a capacidade pulmonar total (CPT) ou de ventilação com volume corrente por 10 minutos são capazes de rearranjar mecanicamente os pulmões, e dessa forma manter o diâmetro alveolar médio o mais próximo do encontrado em pulmões dentro de condições normais, isto é, não submetidos aos procedimentos de preservação. É possível que pulmões submetidos a protocolos de "recrutamento" tenham seu diâmetro alveolar médio trazido para valores próximos da normalidade, uma vez que Silva em 2006³⁵ mostrou que estes protocolos são capazes de reverter, ou ao menos atenuar, as alterações geométricas e mecânicas pulmonares causadas durante a preservação, e previnem a lesão de isquemia e reperfusão.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

1. Estudar o impacto do *flush* vascular pulmonar e da isquemia fria nas propriedades mecânicas e na arquitetura alveolar de pulmões de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Estudar o impacto do *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins no diâmetro alveolar médio de pulmões de ratos;
2. Estudar o impacto do *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins e da isquemia fria no diâmetro alveolar médio de pulmões de ratos;
3. Estudar o impacto do *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins e da isquemia fria no diâmetro alveolar médio de pulmões de ratos submetidos ao recrutamento alveolar à capacidade pulmonar total;
4. Estudar o impacto do *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins e da isquemia fria no diâmetro alveolar médio de pulmões de ratos submetidos à ventilação mecânica com volume corrente durante 10 minutos.

3 Material e métodos

3.1 Animais utilizados

Para a execução do presente estudo foram utilizados 40 ratos machos, da raça *Wistar*, adquiridos no Laboratório BioAgri, Planaltina – DF, com peso entre 280 e 310 gramas.

3.2 Caracterização dos grupos

Os animais foram separados, aleatoriamente, em cinco grupos, caracterizados da seguinte forma:

CTRL Composto por 8 blocos de pulmões isolados submetidos apenas a, aproximadamente, 20 minutos de isquemia em ar ambiente.

Flush Composto por 8 blocos de pulmões isolados submetidos ao *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins (composta por: 3,5 g.L⁻¹ de glicose; 57,5 mmol.L⁻¹ de tampão-fosfato; 10 mmol.L⁻¹ de tampão-bicarbonato; 10 mmol.L⁻¹ de sódio; 115 mmol.L⁻¹ de potássio; osmolaridade: 406) a 4 °C e à 20 minutos de isquemia em ar ambiente.

ISQ Composto por 8 blocos de pulmões isolados submetidos ao *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins a 4 °C e preservados por 10 horas a 4 °C (isquemia fria).

CPT Composto por 8 blocos de pulmões isolados submetidos ao *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins a 4 °C, preservados por 10 horas a 4 °C e recrutados à capacidade pulmonar total (CPT), definida como P_{pt} de 30 cmH₂O, por 2 minutos.

VC Composto por 8 blocos de pulmões isolados submetidos ao *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins a 4 °C, preservados por 10 horas a 4 °C e ventilados com volume corrente de 3 mL, frequência respiratória de 45 irpm e pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 5 cmH₂O durante 10 minutos.

3.3 Extração dos blocos coração-pulmões

Inicialmente os animais foram sedados com Diazepam (5 mg, i.p.), pesados (balança digital Filizola MF-6, São Paulo – SP) e então anestesiados com Thionembutal Sódico (30 mg.kg⁻¹). Em seguida o animal foi colocado adequadamente numa mesa cirúrgica preparada, e então realizada a traqueostomia para a introdução de uma cânula de polietileno (4,5 cm x 2,1 mm), onde a extremidade distal foi conectada a uma torneira de três vias e a extremidade proximal fixada à traquéia com fio de seda. A partir daí os animais foram ventilados mecanicamente em modalidade volume controlado com ar ambiente, frequência respiratória de 80 irpm, volume corrente de 10 ml.kg⁻¹ e PEEP de 3 cmH₂O.

Após os procedimentos supracitados, foi realizada uma laparotomia mediana, seguida de administração de Heparina Sódica (1000 UI.kg⁻¹, i.v.) pela

veia cava inferior. Em seguida, realizada uma esternotomia mediana para acesso torácico. Para exposição da artéria pulmonar o timo foi ressecado. Foi, então, introduzida uma cânula de polietileno (4,5 cm x 1,7 mm) no tronco da artéria pulmonar via ventrículo direito, a qual teve sua extremidade distal conectada a uma torneira de três vias (preenchida com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%). O átrio e o ventrículo esquerdo foram excisados para permitir o fluxo livre de sangue proveniente dos pulmões.

A próxima etapa foi a remoção do bloco coração-pulmões, para os animais do grupo controle. Para os demais grupos, o *flush* vascular pulmonar antecedeu a remoção do bloco coração-pulmões, como descrito no item a seguir. A torneira de três vias foi fechada ao final da inspiração e os pulmões foram mantidos insuflados a 50% da capacidade pulmonar total (CPT). O bloco coração-pulmões foi excisado e colocado imediatamente em uma placa de Petri, em temperatura ambiente, preenchida com solução de preservação Euro-Collins. Foi coberto com um filme plástico para evitar a desidratação e manter a temperatura, e então pronto para o início do experimento.

3.4 *Flush* Vascular Pulmonar

Antes da remoção do bloco coração-pulmões, a circulação pulmonar recebia, via artéria pulmonar, com pressão hidrostática de 20 cmH₂O, 50 mL.kg⁻¹ de *flush* com solução de preservação Euro-Collins a 4 °C. Ao término do *flush* os pulmões eram insuflados e mantidos em 50% da CPT. A partir daí a remoção do bloco coração-pulmões era executada conforme descrito no item 3.3.

3.5 Medida das propriedades mecânicas dos pulmões

Para o estudo das propriedades mecânicas dos pulmões foi utilizado o modelo mecânico reológico bicompartimental viscoelástico, proposto por Bates³⁶ em 1989, o qual foi baseado nos estudos de Mount³⁰ em 1955 e de Sharp³⁷ em 1967. A figura 3 mostra o modelo bicompartimental viscoelástico, que é composto por um amortecedor ($R_{\text{init}, L}$), representando a resistência das vias aéreas, arranjado em paralelo com uma mola ($E_{\text{st}, L}$), representando a elasticidade estática do sistema, a qual está conectada em paralelo com um amortecedor (R_2) ligado em série com uma mola (E_2), representando o componente viscoelástico do sistema respiratório. O volume pulmonar é representado pela distância entre as barras, e o fluxo pela velocidade com que elas se afastam.

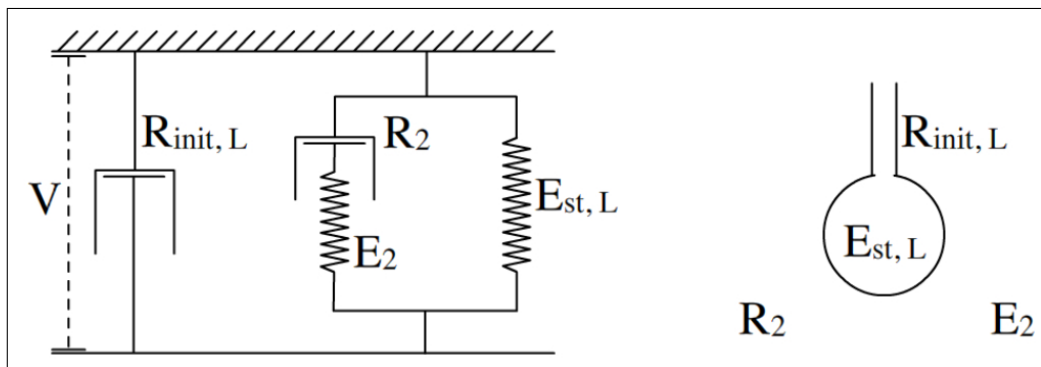


Figura 3: Modelo linear bicompartimental de Mount. Representação mecânica e anatômica.

Para que o sistema se mova, a pressão gerada deve ser suficientemente grande para vencer a pressão total do sistema (soma das pressões resistiva, elástica e viscoelástica), de modo que fluxo aéreo (\dot{V}) possa ser gerado e conseqüentemente volume (V) mobilizado. Todo método de medida afere as respostas do sistema quando este é submetido a um determinado estímulo. Logo, quando o volume é mobilizado em consequência do fluxo aéreo (estímulo) e este é abruptamente interrompido por oclusão rápida das vias aéreas (por meio de

uma válvula inspiratória do ventilador mecânico) e esta permanece mantida por um tempo aproximado de cinco segundos, a distância entre as barras se mantém, como consequência do volume aprisionado nos pulmões. No entanto, variação e acúmulo energético na forma de tensão nas molas e dissipação de energia na forma de calor nos amortecedores (respostas) ocorrem durante a oclusão e sua manutenção. No momento em que a oclusão é realizada, o amortecedor $R_{\text{init, L}}$ conclui o seu trabalho, e conseqüentemente a pressão gerada para vencer este componente vai a zero. Durante a oclusão, a mola E_2 chega a um ponto de equilíbrio elástico onde acumula energia potencial, e a R_2 que está ligada em série com esta mola E_2 continua trabalhando até que dissipe toda a energia empregada no seu trabalho, o que ocorrerá em aproximadamente 5 constantes de tempo. Já a mola $E_{\text{st, L}}$, por estar limitada entre as barras, se mantém deformada com energia potencial acumulada. No momento em que a válvula expiratória do ventilador mecânico é aberta e as vias aéreas são novamente "desobstruídas", todo o sistema retorna ao seu ponto de equilíbrio (capacidade residual funcional).

Para que as propriedades mecânicas pulmonares fossem estudadas pelo método da oclusão rápida das vias aéreas ao final na inspiração, foi utilizado um ventilador mecânico (Samay VR 15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay) de fluxo constante desenvolvido para pequenos animais. Os parâmetros ventilatórios utilizados, foram: ar ambiente, \dot{V} constante de 10 mL.s⁻¹ e V controlado de 2 mL, PEEP de 5 cmH₂O. Ao final da inspiração, era realizada uma oclusão rápida das vias aéreas mantendo-a por seis segundos, seguida de expiração livre. Após a oclusão das vias aéreas ocorre uma queda rápida

de pressão ($\Delta P1$) de um ponto máximo ($P_{\text{máx}}$) até um ponto de inflexão (P_i), seguida de uma queda lenta ($\Delta P2$) até o ponto em que seja atingido o platô pressórico (P_{el}). A queda rápida representa a dissipação de energia para vencer as resistências newtonianas das vias aéreas e dos pulmões, a queda lenta representa a dissipação de energia nos componente viscoelásticos e inhomogeneidades dos tecidos pulmonares, e o platô representa a pressão de retração elástica pulmonar (P_{el}). As variáveis mecânicas foram calculadas utilizando-se as fórmulas abaixo:

$$\Delta P1 = P_{\text{máx}} - P_i$$

$$\Delta P2 = P_i - P_{\text{el}}$$

$$E_{\text{st}} = \frac{P_{\text{el}} - \text{PEEP}}{V}$$

A resistência do equipamento ($R_{\text{eq}} = 0,03 \text{ cmH}_2\text{O.mL}^{-1}.\text{s}$) foi subtraída da resistência total calculada para o sistema respiratório.

3.6 Aquisição dos sinais

Para a aquisição e registros dos sinais foi utilizado um pneumotacógrafo³⁸ contendo três saídas laterais além de suas extremidades, que conectava a traquéia do animal ao ventilador mecânico. Um transdutor diferencial de pressão (PT5A, Grass, Quincy, MA, EUA) foi conectado nas duas saídas laterais distais ao ventilador para registro do fluxo aéreo e, por integração eletrônica, o volume pulmonar. Na saída proximal ao ventilador foi conectado um transdutor absoluto de pressão (P23 Db, Grass, Quincy, MA, EUA) para registro

da pressão na via aérea. Todos os transdutores estavam ligados a um polígrafo (7C, Grass, Quincy, MA, EUA), por onde os sinais passavam e eram filtrados e amplificados para então serem transmitidos a um módulo condicionador de sinais biológicos (EMG System do Brasil, São José dos Campos, São Paulo) e em seguida a um conversor analógico-digital de 12 bits (EMG System do Brasil, São José dos Campos, São Paulo) para a transformação em sinal digital. Já no microcomputador, utilizando frequência de amostragem de 200 Hz, os sinais foram registrados com o *software Windaq/Pro* (DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA).

3.7 Fixação dos pulmões e preparação das lâminas

Ocluído ao final da expiração, que nestas condições experimentais (pulmões isolados, *ex-vivo*) é consideravelmente menor do que a *in-vivo* pela ausência da caixa torácica, o pulmão esquerdo de cada bloco foi congelado por imersão rápida em nitrogênio líquido, imediatamente colocado em solução de *Carnoy* (composta, em volume, por 60% de etanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético) a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Ao término deste período, a desidratação dos pulmões foi realizada por aumento progressivo das concentrações de etanol nas soluções, seguindo a seguinte rotina:

MC-1 70% de etanol, 22,5% de clorofórmio e 7,5% de ácido acético à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
durante 1 hora;

MC-2 80% de etanol, 15% de clorofórmio e 5% de ácido acético à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante
1 hora;

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

Em etanol a 100%, os pulmões foram mantidos a -20 °C durante 4 horas, seguido de 12 horas a 4 °C e, por fim, em temperatura ambiente por 2 horas. Uma vez fixados, os tecidos pulmonares foram processados para cortes histológicos em parafina (3 μm de espessura) e corados com hematoxilina-eosina.³⁹

3.8 Análise morfométrica

A análise morfométrica dos pulmões foi realizada, como previamente descrita por Gundersen,⁴⁰ com um sistema teste coerente e de referência composto por 100 pontos e 50 linhas (comprimento de 1 mm) conectado à uma das oculares do microscópio óptico (Axioplan; Zeiss, Oberkochen, Alemanha). De cada lâmina, quinze campos não coincidentes, escolhidos de forma aleatória, foram utilizados para a realização de tal análise. O aumento microscópico utilizado foi de 400x.

Para o cálculo do diâmetro alveolar médio (DAM) utilizou-se a fórmula seguinte:

$$\text{DAM} = \text{comprimento da linha} \left(\frac{\text{soma do comprimento de todas as linhas}}{\text{n}^\circ \text{ de vezes que as linhas cruzam as paredes dos alvéolos}} \right)$$

3.9 Análise estatística

O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado inicialmente para testar a normalidade da distribuição das variáveis morfométricas e mecânicas dos cinco

grupos estudados. A hipótese nula das variáveis que assumiram uma distribuição normal foi testada pela ANOVA. Quando a hipótese nula era rejeitada, o pós-teste de *Tukey* foi utilizado para comparação dos grupos. A hipótese nula das variáveis que não assumiram uma distribuição normal foi testada por meio do Kruskal-Wallis. Quando a hipótese nula era rejeitada, o teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparação dos grupos. As análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism v.4.03* para Mac OSX. O nível de significância estabelecido foi de 5% para todas as análises.

4 Resultados

Nas figuras 4 e 5 podem ser vistos, respectivamente, o fluxo aéreo e o volume pulmonar administrados durante ventilação mecânica para medida das propriedades mecânicas pulmonares. Os valores mostraram similaridade nos cinco grupos. Tal resultado ratifica a não influência da variação dessas variáveis nas propriedades mecânicas pulmonares.^{41,42}

As figuras 6,7 e 8 mostram os resultados de $\Delta P1$, $\Delta P2$ e E_{st} , respectivamente. Estes resultados evidenciam as alterações mecânicas pulmonares, bem como ratificam as alterações morfométricas também encontradas quando analisado o diâmetro alveolar médio. No componente newtoniano, a dissipação de energia se manteve semelhante em todos os grupos, muito embora o grupo ISQ tenha apresentado tendência de queda em relação ao grupo CTRL ($0,89 \pm 0,06$ vs $1,12 \pm 0,04$, respectivamente. $p > 0,05$). No entanto, quando analisada a dissipação de energia no componente viscoelástico verifica-se forte evidência de aumento da dissipação de energia, quando comparados os grupos CTRL e Flush ($0,48 \pm 0,03$ vs $0,88 \pm 0,05$, respectivamente, $p < 0,001$), CTRL e ISQ ($0,48 \pm 0,03$ vs $0,93 \pm 0,04$, respectivamente, $p < 0,001$), CTRL e CPT ($0,48 \pm 0,03$ vs $0,69 \pm 0,04$, respectivamente, $p < 0,01$), e CTRL e VC ($0,48 \pm 0,03$ vs $0,70 \pm 0,02$, respectivamente, $p < 0,01$). Vimos que todos os grupos tiveram aumento significativo da dissipação de energia no componente viscoelástico quando comparados com o grupo CTRL. Muito embora tenha havido tal aumento comparado ao grupo CTRL, os grupos CPT e VC tiveram valores inferiores aos do grupo ISQ ($0,69 \pm 0,04$ ($p < 0,001$), $0,70 \pm 0,02$ ($p < 0,01$) e $0,93 \pm 0,04$, respectivamente), o que sugere possível efeito protetor dos protoco-

los de recrutamento à CPT e de ventilação com volume corrente por 10 minutos nas propriedades mecânicas pulmonares

Quando analisada a elastância estática na figura 8, esta ratifica as alterações mecânicas provocadas pelo *flush* vascular pulmonar, bem como pela preservação a frio. Também mostra um possível efeito protetor nos grupos CPT e VC, uma vez que apresentam elastância estática significativamente inferior a do grupo ISQ ($3,09 \pm 0,20$ ($p < 0,001$), $4,08 \pm 0,14$ ($p < 0,001$) e $6,28 \pm 0,38$, respectivamente) e o grupo CPT não apresentou diferença significativa em relação ao grupo CTRL ($3,09 \pm 0,20$ vs $2,71 \pm 0,16$, respectivamente, $p > 0,05$).

A análise morfométrica dos pulmões estudados mostrou que o diâmetro alveolar médio dos pulmões submetidos ao *flush* vascular pulmonar não se modificou significativamente em relação aos pulmões do grupo CTRL. No entanto, quando comparados os pulmões do grupo CTRL com os do grupo ISQ, estes mostraram diâmetro alveolar médio significativamente maior que aqueles. Os pulmões submetidos ao *flush* vascular pulmonar, e recrutados à CPT por 2 minutos ou ventilados com volume corrente por 10 minutos apresentaram diâmetro alveolar médio significativamente menor do que os pulmões do grupo CTRL. Não houve diferença significativa entre o diâmetro alveolar médio dos pulmões submetidos ao *flush* vascular pulmonar e recrutados à CPT por 2 minutos e os ventilados com volume corrente por 10 minutos. A figura 9 mostra a relação do diâmetro alveolar médio entre os grupos estudados.

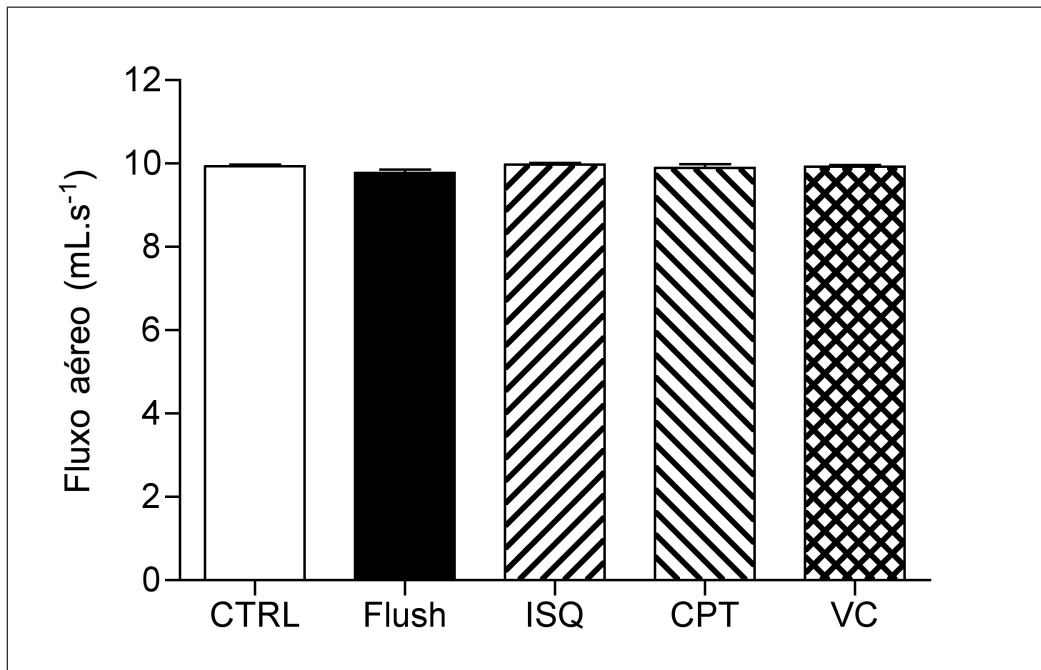


Figura 4: Média do fluxo aéreo dos grupos estudados. As barras representam a média + erro padrão.

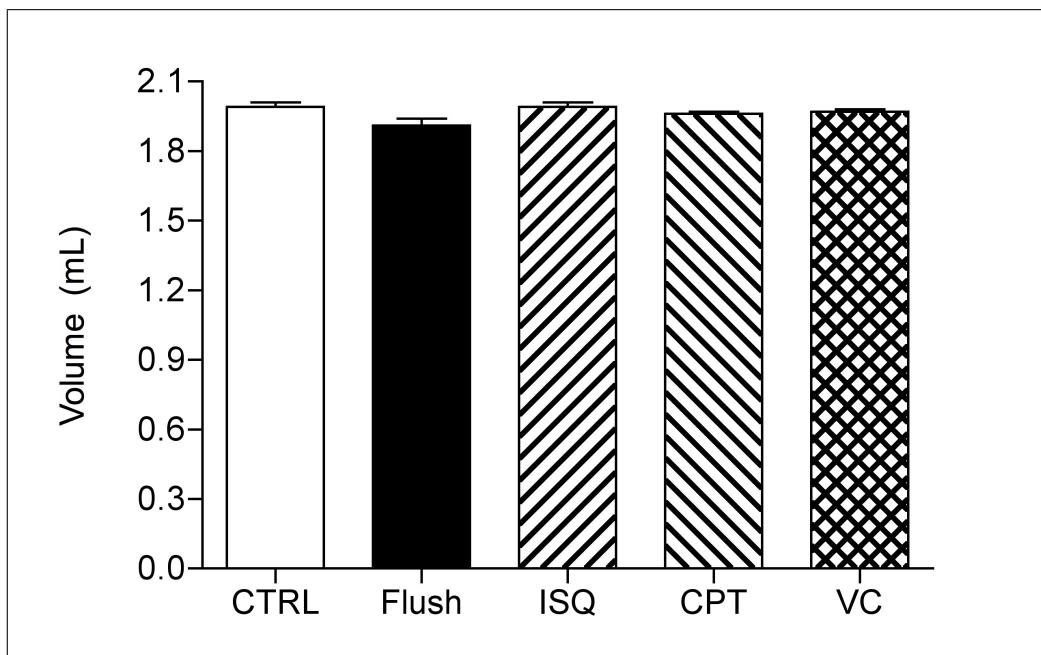


Figura 5: Volume pulmonar dos grupos estudados. As barras representam a média + erro padrão.

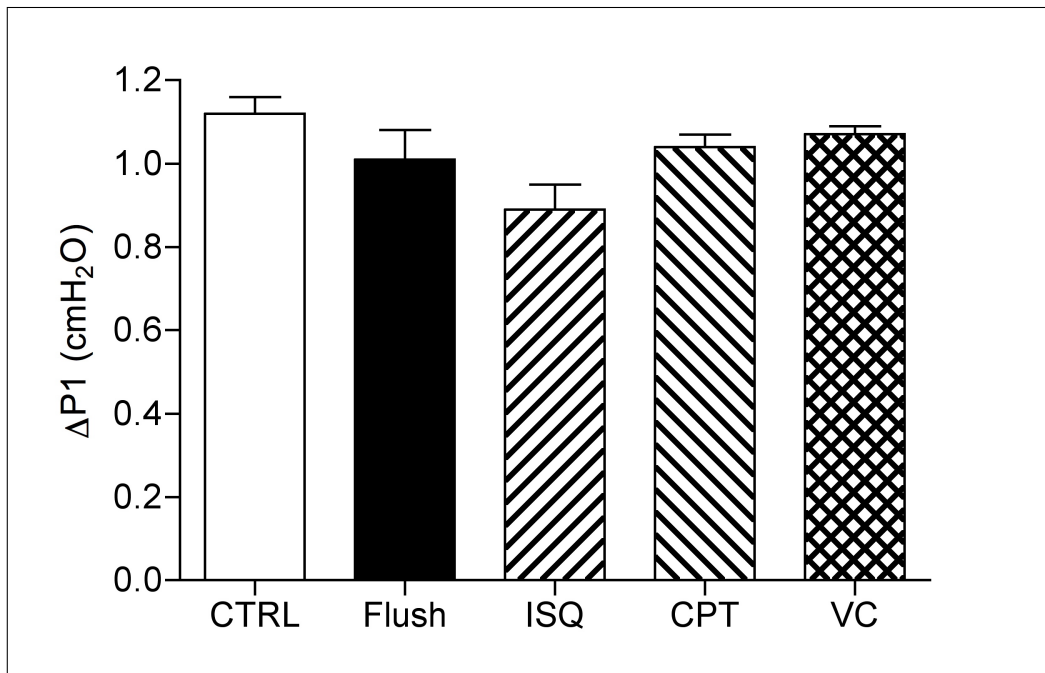


Figura 6: Variação de pressão no componente newtoniano de força.

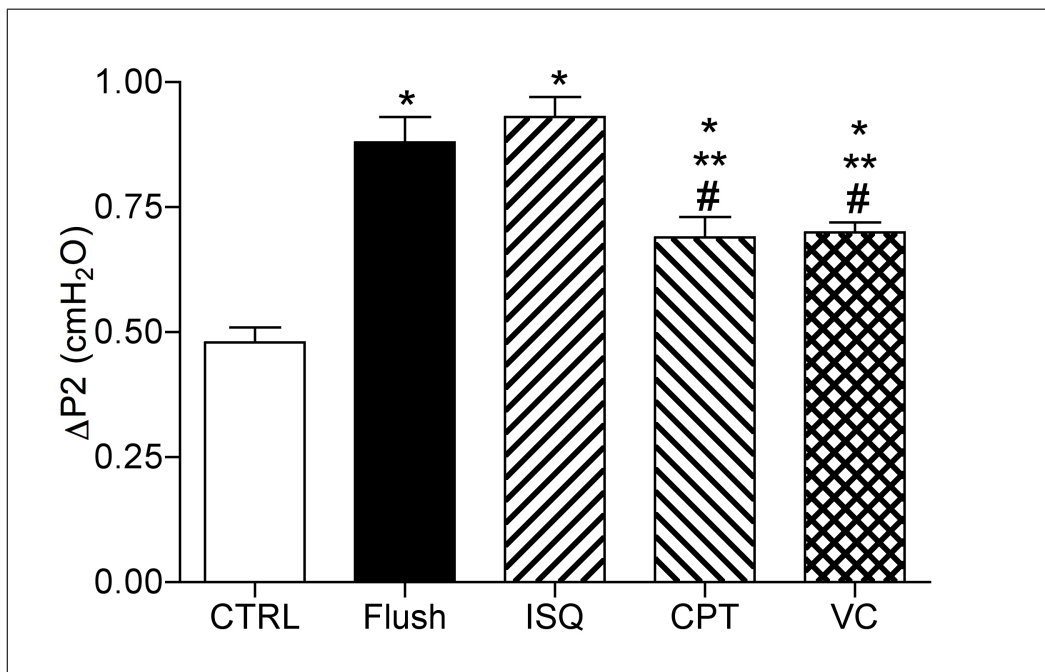


Figura 7: Variação de pressão no componente viscoelástico. *: $p < 0,01$ em relação ao grupo CTRL; **: $p < 0,01$ em relação ao grupo *Flush*; #: $p < 0,01$ em relação ao grupo ISQ.

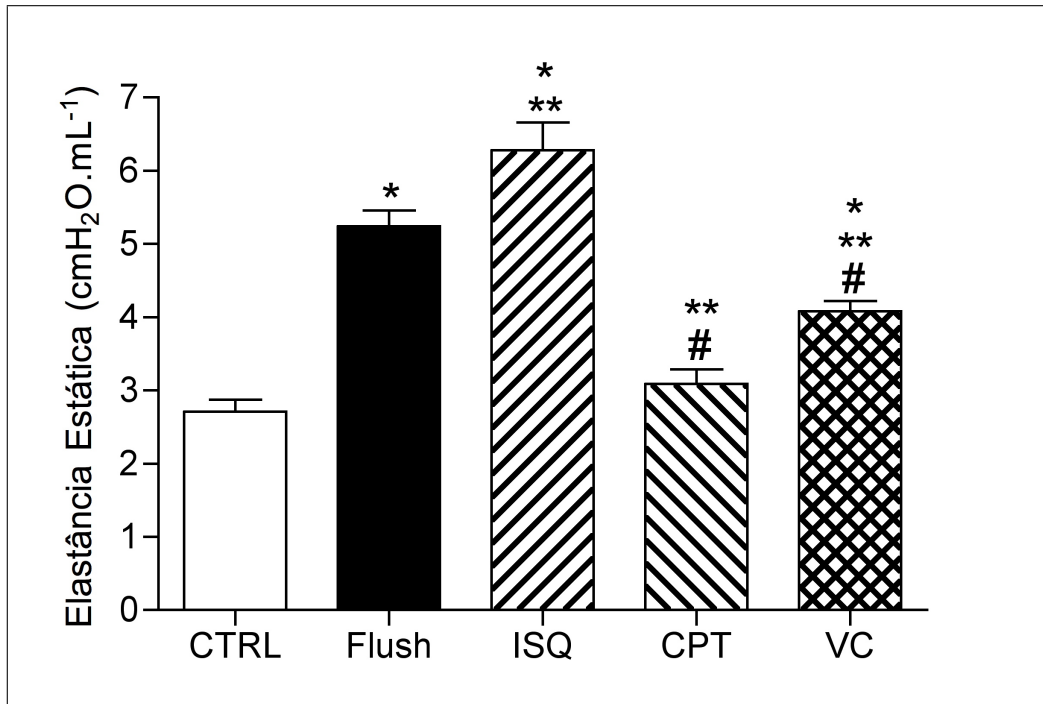


Figura 8: Elastância estática dos pulmões. *: $p < 0,01$ em relação ao grupo CTRL; **: $p < 0,01$ em relação ao grupo *Flush*; #: $p < 0,01$ em relação ao grupo ISQ.

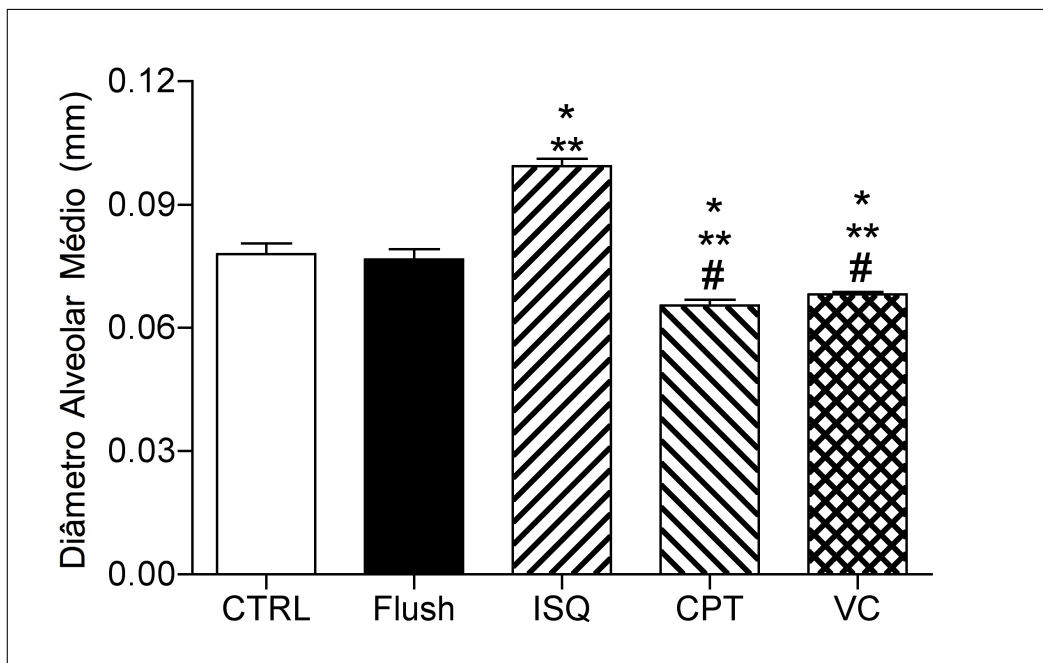


Figura 9: Diâmetro alveolar médio dos grupos estudados. As barras representam a média + erro-padrão da média. *: $p < 0,05$ em relação ao grupo CTRL; **: $p < 0,05$ em relação ao grupo *Flush*; #: $p < 0,05$ em relação ao grupo ISQ.

5 Discussão

O fato de substituir o sangue do leito vascular pulmonar por solução de preservação Euro-Collins, bem como a estocagem dos pulmões por 10h em isquemia fria aumentou a impedância pulmonar e alterou a estrutura alveolar. As alterações mecânicas observadas nos grupos *Flush* e ISQ (aumento da elastância e ΔP_2) podem ser explicadas pela influência dos fatores hemodinâmicos pulmonares, os quais são responsáveis por grande parte da estabilidade mecânica do parênquima pulmonar. Tanto a pressão capilar pulmonar^{21,43} quanto o fluxo sanguíneo pulmonar^{22,44} assumem uma parcela de "responsabilidade", na manutenção da higidez arquitetural dos pulmões, bem como das propriedades mecânicas do tecido pulmonar. Isto se deve ao fato de que os septos alveolares são formados, em grande parte, por uma malha de vasos sanguíneos e por fibras elásticas e colágenas, e sua forma depende da interação destes dois fatores citados com a tensão superficial da interface ar-líquido.^{45,46}

No momento em que o sangue é substituído por solução de preservação Euro-Collins, esta permanece parada no leito vascular pulmonar, o que já afeta dois dos três fatores responsáveis pela estabilidade mecânica pulmonar, pressão capilar pulmonar e fluxo sanguíneo pulmonar. A pressão capilar cai, pois neste modelo o átrio e o ventrículo esquerdo foram excisados, e a solução de preservação Euro-Collins permanece parada no leito vascular. O resultado disso é o aumento da elastância pulmonar e o aumento da dissipação de energia no componente viscoelástico pulmonar (ΔP_2). Este último certamente pela formação de diversas constantes de tempo. Essas informações parecem não fazer sentido com os resultados da morfometria, pois os pulmões do grupo *Flush* não apre-

sentaram diâmetro alveolar médio significativamente menor do que os pulmões do grupo CTRL, e os pulmões do grupo ISQ apresentaram diâmetro alveolar médio significativamente maior do que os pulmões do grupo CTRL. Ora, como pode haver alterações mecânicas nestes grupos sem justificativa (complementar) morfométrica? Silva em 2006³⁵ mostrou que pulmões submetidos a *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins e isquemia fria por 10h apresentam relação de área alveolar de diâmetro normal inferior (aproximadamente 20%) a de pulmões minimamente lesados, por outro lado, a relação de área alveolar colapsada foi de aproximadamente 75% maior do que a dos pulmões minimamente lesados, e a relação de área alveolar hiperinsuflada aproximadamente 200% superior a dos pulmões minimamente lesados. Logo, estes resultados apresentados por Silva em 2006,³⁵ especialmente a relação de área alveolar hiperinsuflada, contribuem fortemente para que o diâmetro alveolar médio dos pulmões do grupo ISQ seja significativamente maior do que o do grupo CTRL, e ainda assim apresentando comprometimento das propriedades mecânicas pulmonares, aumento de ΔP_2 e aumento da elastância.

Outro potencial fator causador das alterações morfométricas e mecânicas pulmonares pode estar ligado ao surfactante, especialmente a inativação de sua atividade. É sabido que até 12h após *flush* vascular pulmonar com solução de preservação similar ao Euro-Collins há diminuição dos principais fosfolípidos do surfactante.⁴⁷ Se o *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins é capaz de alterar as propriedades do surfactante, haverá abalo na tensão superficial da interface ar-líquido, corroborando com o aumento da inhomogeneidade e na formação de diferentes constantes de tempo, o que se traduz

e traduziu em aumento da energia dispendida no componente viscoelástico.

Muito embora tais alterações tenham ocorrido, no momento em que os pulmões foram submetidos aos protocolos de recrutamento alveolar até a CPT por 2 minutos ou ventilação com volume corrente por 10 minutos, os efeitos deletérios do *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins, bem como da isquemia fria por 10h, foram atenuados, refletidos pelas propriedades mecânicas voltarem para próximo das propriedades mecânicas dos pulmões do grupo CTRL. A melhora apresentada pelos grupos CPT e VC se deve ao fato destes pulmões estarem em condições mecânicas favoráveis, ou pelo menos em condições de menor instabilidade arquitetural e mecânica, proporcionadas pelos protocolos citados. Uma vez que os pulmões são submetidos ao *flush* vascular e a isquemia fria, ocorre um desarranjo arquitetural, o que os colocam em condições ventilatórias desfavoráveis, haja vista o incremento na pressão crítica de abertura das vias aéreas. A ventilação com volume corrente por 10 minutos ajuda a dar funcionalidade mecânica a mais unidades alveolares, o que diminui a pressão crítica de abertura das vias aéreas, assim como ocorre com os pulmões submetidos a recrutamento alveolar á CPT por 2 minutos. No entanto, além de colocá-los em condições funcionais por efeito mecânico junto ao parênquima, também há relato de que o recrutamento alveolar estimula a liberação de surfactante,^{48,49} o que faz sentido quando relacionado ao fato de que pode haver inativação de surfactante pelo simples fato de submeter os pulmões ao *flush* vascular com solução de preservação Euro-Collins.

Dessa forma, as informações supracitadas estão de acordo com os resultados desse trabalho, onde verificamos a atenuação do desarranjo mecânico e

arquitetural causado pelo *flush* vascular pulmonar e pela isquemia fria. Tanto a elastância quanto o ΔP_2 diminuíram para valores próximos aos do grupo CTRL, assim com ocorreu com o diâmetro alveolar médio, que também retornou para valores próximos aos do grupo controle.

6 Conclusão

1. A elastância e o $\Delta P2$ aumentam significativamente nos pulmões submetidos ao *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins;
2. A elastância e o $\Delta P2$ aumentam significativamente nos pulmões submetidos ao *flush* vascular pulmonar com solução de preservação Euro-Collins e armazenados em hipotermia por 10h;
3. A utilização das estratégias ventilatórias antes das medidas preservam os pulmões de um mau desempenho mecânico e trazem o diâmetro alveolar médio para valores próximos aos do grupo CTRL;
4. O *flush* vascular pulmonar não altera o diâmetro alveolar médio, mas o acréscimo da isquemia fria faz aumentar significativamente o diâmetro alveolar médio.

Referências Bibliográficas

- [1] R. Lama, F. Santos, A. Alvarez, F. J. Algar, C. Baamonde, F. Quero, F. Cerezo, and A. Salvatierra. Analysis of lung transplant recipients surviving beyond 5 years. *Transplant Proc*, 37(3):1523–1525, Apr 2005.
- [2] Jason D Christie, Leah B Edwards, Paul Aurora, Fabienne Dobbels, Richard Kirk, Axel O Rahmel, David O Taylor, Anna Y Kucheryavaya, and Marshall I Hertz. Registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-fifth official adult lung and heart/lung transplantation report–2008. *J Heart Lung Transplant*, 27(9):957–969, Sep 2008.
- [3] C. Chaparro, M. Scavuzzo, T. Winton, S. Keshavjee, and S. Kesten. Status of lung transplant recipients surviving beyond five years. *J Heart Lung Transplant*, 16(5):511–516, May 1997.
- [4] H. Itano, M. Aoe, S. Ichiba, M. Yamashita, H. Date, A. Andou, and N. Shimizu. Partial liquid ventilation for acute allograft dysfunction after canine lung transplantation. *Ann Thorac Surg*, 67(2):332–339, Feb 1999.
- [5] M. Liu, A. K. Tanswell, and M. Post. Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. *Am J Physiol*, 277(4 Pt 1):L667–L683, Oct 1999.
- [6] J. D. Cooper. The evolution of techniques and indications for lung transplantation. *Ann Surg*, 212(3):249–55; discussion 255–6, Sep 1990.

- [7] L. B. Ware, J. A. Golden, W. E. Finkbeiner, and M. A. Matthay. Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, 159(3):980–988, Mar 1999.
- [8] M. Sugita, S. Suzuki, T. Kondo, M. Noda, and S. Fujimura. Transalveolar fluid absorption ability in rat lungs preserved with euro-collins solution and ep4 solution. *Transplantation*, 67(3):349–354, Feb 1999.
- [9] R. F. Kelly. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med*, 136(6):427–440, Dec 2000.
- [10] S. H. Keshavjee, F. Yamazaki, P. F. Cardoso, D. I. McRitchie, G. A. Patterson, and J. D. Cooper. A method for safe twelve-hour pulmonary preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 98(4):529–534, Oct 1989.
- [11] A. B. Al-Mehdi, H. Shuman, and A. B. Fisher. Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am J Physiol*, 272(2 Pt 1):L294–L300, Feb 1997.
- [12] I. Koyama, T. J. Toung, M. C. Rogers, G. H. Gurtner, and R. J. Traystman. O₂ radicals mediate reperfusion lung injury in ischemic o₂-ventilated canine pulmonary lobe. *J Appl Physiol*, 63(1):111–115, Jul 1987.
- [13] K. N. DeCampos, S. Keshavjee, M. Liu, and A. S. Slutsky. Prevention of rapid reperfusion-induced lung injury with prostaglandin e₁ during the initial period of reperfusion. *J Heart Lung Transplant*, 17(11):1121–1128, Nov 1998.

- [14] K. N. DeCampos, S. Keshavjee, A. S. Slutsky, and M. Liu. Alveolar recruitment prevents rapid-reperfusion-induced injury of lung transplants. *J Heart Lung Transplant*, 18(11):1096–1102, Nov 1999.
- [15] T. Fukuse, T. Hirata, T. Nakamura, M. Kawashima, S. Hitomi, and H. Wada. Influence of deflated and anaerobic conditions during cold storage on rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med*, 160(2):621–627, Aug 1999.
- [16] M. Haniuda, S. Hasegawa, T. Shiraishi, C. M. Dresler, J. D. Cooper, and G. A. Patterson. Effects of inflation volume during lung preservation on pulmonary capillary permeability. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 112(1):85–93, Jul 1996.
- [17] A. F. Pierre, K. N. DeCampos, M. Liu, V. Edwards, E. Cutz, A. S. Slutsky, and S. H. Keshavjee. Rapid reperfusion causes stress failure in ischemic rat lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 116(6):932–942, Dec 1998.
- [18] A. O. Halldorsson, M. Kronon, B. S. Allen, S. Rahman, T. Wang, M. Layland, and D. Sidle. Controlled reperfusion prevents pulmonary injury after 24 hours of lung preservation. *Ann Thorac Surg*, 66(3):877–84; discussion 884–5, Sep 1998.
- [19] A. Halldorsson, M. Kronon, B. S. Allen, K. S. Bolling, T. Wang, S. Rahman, and H. Feinberg. Controlled reperfusion after lung ischemia: implications for improved function after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 115(2):415–24; discussion 424–5, Feb 1998.

- [20] H. Schütte, G. Hermle, W. Seeger, and F. Grimminger. Vascular distension and continued ventilation are protective in lung ischemia/reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med*, 157(1):171–177, Jan 1998.
- [21] Ferenc Peták, Walid Habre, Zoltán Hantos, Peter D Sly, and Denis R Morel. Effects of pulmonary vascular pressures and flow on airway and parenchymal mechanics in isolated rat lungs. *J Appl Physiol*, 92(1):169–178, Jan 2002.
- [22] N. J. Freezer, C. J. Lanteri, and P. D. Sly. Effect of pulmonary blood flow on measurements of respiratory mechanics using the interrupter technique. *J Appl Physiol*, 74(3):1083–1088, Mar 1993.
- [23] Ferenc Peták, Barna Babik, Zoltán Hantos, Denis R Morel, Jean-Claude Pache, Catherine Biton, Béla Suki, and Walid Habre. Impact of microvascular circulation on peripheral lung stability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287(4):L879–L889, Oct 2004.
- [24] H. G. Borst, E. Berglund, J. L. Whittenberger, J. Mead, M. McGregor, and C. Collier. The effect of pulmonary vascular pressures on the mechanical properties of the lungs of anesthetized dogs. *J Clin Invest*, 36(12):1708–1714, Dec 1957.
- [25] B. A. Gray, D. R. McCaffree, E. D. Sivak, and H. T. McCurdy. Effect of pulmonary vascular engorgement on respiratory mechanics in the dog. *J Appl Physiol*, 45(1):119–127, Jul 1978.

- [26] H. J. Colebatch, C. K. Ng, N. Berend, and F. J. Maccioni. Effect of the chest wall and blood volume on pulmonary distensibility. *J Appl Physiol*, 72(1):186–193, Jan 1992.
- [27] B. A. Simon, K. Tsuzaki, and J. G. Venegas. Changes in regional lung mechanics and ventilation distribution after unilateral pulmonary artery occlusion. *J Appl Physiol*, 82(3):882–891, Mar 1997.
- [28] J. T. Sharp, J. P. Henry, S. K. Sweany, W. R. Meadows, and R. J. Pietras. Total respiratory inertance and its gas and tissue components in normal and obese men. *J Clin Invest*, 43:503–509, Mar 1964.
- [29] J. H. Bates, A. Rossi, and J. Milic-Emili. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J Appl Physiol*, 58(6):1840–1848, Jun 1985.
- [30] L. E. Mount. The ventilation flow-resistance and compliance of rat lungs. *J Physiol*, 127(1):157–167, Jan 1955.
- [31] A. B. Otis, C. B. Mckerrow, R. A. Bartlett, J. Mead, M. B. Mcilroy, N. J. Selver-Stone, and E. P. Radford. Mechanical factors in distribution of pulmonary ventilation. *J Appl Physiol*, 8(4):427–443, Jan 1956.
- [32] J. Mead. Contribution of compliance of airways to frequency-dependent behavior of lungs. *J Appl Physiol*, 26(5):670–673, May 1969.
- [33] W. A. Zin, L. D. Pengelly, and J. Milic-Emili. Partitioning of respiratory mechanics in anesthetized cats. *J Appl Physiol*, 54(3):708–713, Mar 1983.

- [34] J. H. Bates, P. Baconnier, and J. Milic-Emili. A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. *J Appl Physiol*, 64(5):2204–2214, May 1988.
- [35] César Augusto Melo e Silva. *Influência das propriedades mecânicas e da arquitetura alveolar de pulmões preservados na patogênese da lesão de reperfusão pulmonar*. PhD thesis, Universidade de Brasília – UnB, 2006.
- [36] J. H. Bates, K. A. Brown, and T. Kochi. Respiratory mechanics in the normal dog determined by expiratory flow interruption. *J Appl Physiol*, 67(6):2276–2285, Dec 1989.
- [37] J. T. Sharp, F. N. Johnson, N. B. Goldberg, and P. Van Lith. Hysteresis and stress adaptation in the human respiratory system. *J Appl Physiol*, 23(4):487–497, Oct 1967.
- [38] J. P. Mortola and A. Noworaj. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. *J Appl Physiol*, 55(1 Pt 1):250–253, Jul 1983.
- [39] M. F. Silva, W. A. Zin, and P. H. Saldiva. Airspace configuration at different transpulmonary pressures in normal and paraquat-induced lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 158(4):1230–1234, Oct 1998.
- [40] H. J. Gundersen. Stereology—or how figures for spatial shape and content are obtained by observation of structures in sections. *Microsc Acta*, 83(5):409–426, Nov 1980.

- [41] T. Kochi, S. Okubo, W. A. Zin, and J. Milic-Emili. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. *J Appl Physiol*, 64(1):441–450, Jan 1988.
- [42] T. Kochi, S. Okubo, W. A. Zin, and J. Milic-Emili. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects of flow and volume. *J Appl Physiol*, 64(6):2636–2646, Jun 1988.
- [43] J. O. Auler, W. A. Zin, M. P. Caldeira, W. V. Cardoso, and P. H. Saldiva. Pre- and postoperative inspiratory mechanics in ischemic and valvular heart disease. *Chest*, 92(6):984–990, Dec 1987.
- [44] M. Ishii, N. Matsumoto, T. Fuyuki, W. Hida, M. Ichinose, H. Inoue, and T. Takishima. Effects of hemodynamic edema formation on peripheral vs. central airway mechanics. *J Appl Physiol*, 59(5):1578–1584, Nov 1985.
- [45] Ewald R Weibel, Bernard Sapoval, and Marcel Filoche. Design of peripheral airways for efficient gas exchange. *Respir Physiol Neurobiol*, 148(1-2):3–21, Aug 2005.
- [46] M. Rodriguez, S. Bur, A. Favre, and E. R. Weibel. Pulmonary acinus: geometry and morphometry of the peripheral airway system in rat and rabbit. *Am J Anat*, 180(2):143–155, Oct 1987.
- [47] R. S. Andrade, E. E. Solien, O. D. Wangensteen, M. Y. Tsai, V. R. Kshetry, and R. M. Bolman. Surfactant dysfunction in lung preservation. *Transplantation*, 60(6):536–541, Sep 1995.

- [48] J. N. Hildebran, J. Goerke, and J. A. Clements. Surfactant release in excised rat lung is stimulated by air inflation. *J Appl Physiol*, 51(4):905–910, Oct 1981.
- [49] H. R. Wirtz and L. G. Dobbs. Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. *Science*, 250(4985):1266–1269, Nov 1990.