

Artigo Original

Pré-condicionamento isquêmico por oclusão seletiva da artéria pulmonar em ratos*

Ischemic preconditioning by selective occlusion of the pulmonary artery in rats

Eduardo Sperb Pilla¹, Giovanni Schirmer Vendrame², Pablo Gerardo Sánchez³,
Gustavo Grun², Eduardo Fontena², Luiz Alberto Forgiarini Júnior⁴,
Norma Anair Possa Marroni⁵, Cristiano Feijó Andrade⁶, Paulo Francisco Guerreiro Cardoso⁷

Resumo

Objetivo: Avaliar o efeito do pré-condicionamento isquêmico (PCI) em modelo de isquemia e reperfusão (I/R) pulmonar normotérmica em ratos, quantificando a produção de espécies reativas do oxigênio. **Métodos:** Quarenta e sete ratos Wistar foram randomizados em quatro grupos: controle, sham, I/R e PCI. Após anestesia, animais do grupo controle foram sacrificados por decapitação, pneumonectomizados, e os pulmões esquerdos armazenados em nitrogênio líquido. Animais dos grupos sham, I/R e PCI foram anestesiados, traqueostomizados, ventilados, anticoagulados e submetidos a uma toracotomia esquerda com dissecação da artéria pulmonar esquerda para clameamento. No grupo sham procedeu-se a dissecação da artéria pulmonar esquerda; no grupo I/R, clameamento hilar total de 30 min e no grupo PCI, clameamento da artéria pulmonar esquerda por 5 min seguido por reperfusão de 10 min e um clameamento hilar total de 30 min. Pulmões foram reperfundidos por 90 min e ventilados com os mesmos parâmetros, acrescidos de pressão expiratória final positiva de 1 cmH₂O. Foram obtidas medidas hemodinâmicas e gasométricas antes da toracotomia, antes do clameamento hilar total, aos 30 e 90 min de reperfusão. A peroxidação lipídica foi estabelecida por meio da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. **Resultados:** A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico analisada nos grupos controle, sham, I/R, PCI não revelou diferenças significativas, o mesmo ocorrendo com a pressão parcial arterial de oxigênio, pressão parcial arterial de gás carbônico e medidas hemodinâmicas entre os grupos sham, I/R e PCI. **Conclusões:** O PCI de 5 min da artéria pulmonar esquerda em modelo de I/R in situ em ratos não atenua a lesão de I/R.

Descritores: Isquemia; Reperfusão; Preservação de órgãos; Espécies de oxigênio reativas.

Abstract

Objective: To evaluate the effect of lung ischemic preconditioning (IPC) on normothermic ischemia/reperfusion (I/R) injury in a rat model, quantifying the production of reactive oxygen species. **Methods:** Forty-seven male Wistar rats were randomized into four groups: control, sham, I/R and IPC. Control group animals were anesthetized and killed by decapitation, after which pneumonectomy was performed and the left lungs were stored in liquid nitrogen. Sham, IPC and I/R group rats were anesthetized, tracheostomized, ventilated, anticoagulated and submitted to left thoracotomy with dissection of the left pulmonary artery for clamping. Sham group rats underwent dissection of the left pulmonary artery, I/R group rats underwent 30 min of total hilar clamping, and IPC group rats underwent 5-min clamping of the left pulmonary artery followed by 30 min of total hilar clamping. Lungs were reperfused for 90 min and ventilated with the same parameters, with additional positive end-expiratory pressure of 1 cmH₂O. Hemodynamic and blood gas values were obtained prior to thoracotomy, prior to total hilar clamping, after 30 min of reperfusion and after 90 min of reperfusion. Lipid peroxidation was determined by measuring levels of thiobarbituric acid reactive substances. **Results:** There were no significant differences among the groups in terms of the levels of thiobarbituric acid reactive substances. Nor were there any significant differences among the sham, I/R and IPC groups in terms of arterial oxygen tension, arterial carbon dioxide tension or hemodynamic values. **Conclusions:** In an in situ I/R rat model, 5-min IPC of the left pulmonary artery does not attenuate I/R injury.

Keywords: Ischemia; Reperfusion; Organ preservation; Reactive oxygen species.

* Trabalho realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental Jean Carlo Kohmann da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre – FFFCMPA – e no Laboratório de Hepatologia Experimental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre (RS) Brasil.

1. Aluno do Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre – FFFCMPA – Porto Alegre (RS) Brasil.

2. Aluno do Curso de Medicina. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre – FFFCMPA – Porto Alegre (RS) Brasil.

3. Aluno do Curso de Doutorado da Pós-graduação em Pneumologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre (RS) Brasil.

4. Fisioterapeuta. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre – FFFCMPA – Porto Alegre (RS) Brasil.

5. Professora Titular de Fisiologia Humana. Universidade Luterana do Brasil – ULBRA – Canoas (RS) Brasil.

6. Cirurgião Torácico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre (RS) Brasil.

7. Professor Associado do Departamento de Cirurgia, Disciplina de Cirurgia Torácica. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre – FFFCMPA – Porto Alegre (RS) Brasil.

Endereço para correspondência: Paulo Francisco Guerreiro Cardoso. Pavilhão Pereira Filho, Santa Casa de Porto Alegre, Rua Prof. Annes Dias, 285, 1-PPF, CEP 90020-090, Porto Alegre, RS, Brasil.

Tel 55 51 3221-2232. E-mail: cardosop@gmail.com

Recebido para publicação em 9/10/2007. Aprovado, após revisão, em 26/11/2007.

Introdução

O estresse oxidativo, caracterizado pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), ocorre na maioria das células pulmonares. Existem dois mecanismos que usualmente geram sua produção. Um desses mecanismos envolve o acúmulo de hipoxantina e a conversão de xantina desidrogenase em xantina oxidase durante a hipóxia, e posterior degradação da hipoxantina em superóxido no momento da reoxigenação. O outro mecanismo é dependente do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida presente no endotélio e na membrana plasmática de neutrófilos e macrófagos, e é responsável por catalisar a redução do oxigênio em peróxido de hidrogênio e superóxido.⁽¹⁾

No transplante pulmonar, a lesão induzida pela isquemia e reperfusão (I/R) do enxerto, associada à baixa tolerância deste órgão à isquemia, permanece como a principal causa de morbidade e mortalidade precoces no período pós-operatório. Essa síndrome ocorre normalmente dentro de 72 h após o transplante e se caracteriza por um aumento da permeabilidade capilar pulmonar, edema pulmonar, hipoxemia e aumento da resistência vascular pulmonar.⁽²⁾

Estudos em modelos animais têm se concentrado na prevenção da I/R, bem como na melhora dos métodos de preservação pulmonar⁽²⁾ por meio do uso de hiperinsuflação pulmonar,⁽³⁾ preservação hipotérmica,⁽⁴⁾ soluções de preservação,⁽⁵⁾ vasodilatadores,⁽⁶⁾ perfusão pulmonar por via retrógrada,⁽⁷⁾ captadores de ERO,⁽⁸⁾ terapia gênica,⁽⁹⁾ ventilação líquida,⁽¹⁰⁾ além do pré-condicionamento isquêmico (PCI). O PCI consiste em um fenômeno no qual um breve episódio de I/R promove uma proteção tecidual contra um posterior episódio isquêmico prolongado e o dano de reperfusão resultante. Tem sido estudado em vários órgãos e tecidos, tais como coração, rim, fígado, intestino, cérebro, músculo esquelético e pulmão,⁽¹¹⁾ tanto em modelos animais quanto em estudos clínicos.⁽¹²⁾ Na maioria dos estudos em pulmões, o PCI foi realizado por meio de clampeamento hilar total, fato este que não corresponde à realidade clínica dos transplantes, na qual a artéria pulmonar é isolada para clampeamento em separado das demais estruturas hilares.

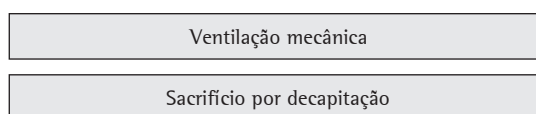
Com base nesses aspectos, testamos a hipótese de que o PI por oclusão seletiva da artéria pulmonar

poderia diminuir o dano pulmonar resultante da IR em um modelo experimental animal.

Métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo nº 004084-5/6) da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. Foram utilizados 47 ratos Wistar machos pesando entre 250 g e 470 g. Todos os animais receberam cuidados de acordo com as normas internacionais que regem a pesquisa com animais de laboratório.⁽¹³⁾ Os animais foram randomizados em quatro grupos: controle, sham, I/R (normotérmica) e PCI. Os procedimentos em cada grupo foram: controle (n = 10), ausência de ventilação mecânica (VM) e sacrifício por decapitação; sham (n = 12), dissecação do hilo pulmonar sem clampeamento; I/R (n = 13), clampeamento hilar total por 30 min; PCI (n = 12), clampeamento da artéria pulmonar esquerda por 5 min (pré-condicionamento) seguido por reperfusão de 10 min e um clampeamento hilar total de 30 min (Figura 1).

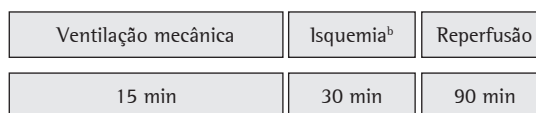
Grupo controle



Grupo Sham



Grupo I/R



Grupo PCI

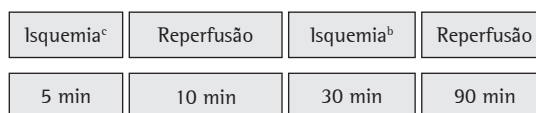


Figura 1 – Os protocolos realizados nos quatro grupos. I/R: isquemia e reperfusão; e PCI: pré-condicionamento isquêmico. ^aVentilação mecânica com pressão expiratória final positiva 1 cmH₂O. ^bClampeamento do brônquio principal, da artéria pulmonar e das veias pulmonares esquerdos (hilar total). ^cClampeamento seletivo da artéria pulmonar esquerda.

Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) via intraperitoneal, e atropina (0,20 mg) via intramuscular no momento da indução, sendo a anestesia mantida por administração de um terço da dose inicial das drogas a cada 30 min. Os animais receberam heparinização sistêmica (1 mg/kg) via parenteral, sendo submetidos a traqueostomia cervical com cânula plástica (Abbocath® nº 14; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA), e VM em ventilador volumétrico (Harvard Rodent Ventilator, modelo 683; Harvard Apparatus Co., Millis, MA, EUA), com volume corrente = 10 mL/kg de peso corporal, frequência = 70-80 ciclos/min, fração inspirada de oxigênio = 0,2 (ar ambiente) e pressão expiratória final positiva de 1 cmH₂O apenas no momento da reperfusão pulmonar (90 min finais do procedimento; Figura 1). A cada clameamento hilar total ou arterial seletivo realizou-se expansão pulmonar por oclusão da válvula expiratória por 3 ciclos inspiratórios, com o objetivo de evitar atelectasia. A pressão arterial média sistêmica foi medida por canulação da artéria carótida direita (Sirecust 730; Siemens, Solna, Suécia), sendo esta utilizada na coleta de amostras para análise dos gases arteriais (ABL 5; Radiometer, Copenhagen, Dinamarca). A pressão arterial média sistêmica e os gases arteriais foram mensurados antes da toracotomia (basal); antes do período de isquemia de 30 min (clameamento hilar total) nos grupos I/R e PCI e aos 15 min de VM no grupo sham; aos 30 min e 90 min de reperfusão (antes do sacrifício).

Utilizou-se um microscópio cirúrgico (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) na dissecação das estruturas hilares e na canulação arterial. Após a traqueostomia e a canulação da carótida direita, realizou-se uma toracotomia esquerda no quinto espaço intercostal, o ligamento pulmonar foi seccionado e o ápice do pulmão esquerdo tracionado caudalmente com o auxílio de uma haste flexível com ponta de algodão. Em seguida, a artéria pulmonar esquerda foi isolada para clameamento seletivo com o auxílio de um microclipe vascular (Figura 1). Após o período de reperfusão de 90 min, o pulmão esquerdo foi seccionado e armazenado a -80 °C. O tempo total de VM a que os animais dos grupos sham, I/R e PCI foram submetidos foi de 135 min. (Figura 1).

Os pulmões armazenados em freezer a -80 °C foram descongelados à temperatura ambiente, e homogeneizados com 9 mL de tampão fosfato

(KCl 140 mM, fosfato 20 mM pH 7,4) por grama de tecido. Acrescentou-se ao homogeneizado fluoreto de fenilmetilsulfonyl na concentração de 100 nM em isopropanol e na quantidade de 10 µL/mL de tampão adicionado, além de um inibidor de proteases. O tecido foi homogeneizado em Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Staufen, Alemanha) durante 40 s à temperatura de 0 a 2 °C, sendo posteriormente centrifugado em centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B refrigerated superspeed centrifuge; DuPont, Wilmington, DE, EUA) por 10 min a 3.000 rpm (1.110 × g). O precipitado foi desprezado e o sobrenadante retirado, congelado em freezer em temperatura de -80 °C para ser posteriormente utilizado nas dosagens. A concentração de proteínas dos homogeneizados foi determinada utilizando-se uma técnica previamente descrita.⁽¹⁴⁾

Foi realizada a dosagem de *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). As amostras de tecido foram colocadas em tubo de ensaio e receberam 0,75 mL de ácido tricloroacético 10%, 0,25 mL do homogeneizado, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% e 25 mL de água destilada. Cada tubo foi agitado e aquecido a 100°C, sendo, posteriormente, resfriado e acrescido de 1,5 mL de álcool n-butílico. Em seguida, foi colocado em agitador (Biomatic, Porto Alegre, Brasil) por 45 s e centrifugado por 10 min a 3.000 rpm (1.110 × g). Por último, o produto corado foi retirado e lido em espectrofotômetro (CARY 3E UV-Visible Spectrophotometer; Varian,

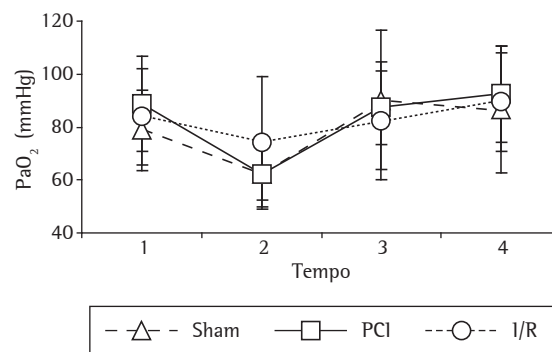


Figura 2 - Pressão parcial arterial de oxigênio (PaO₂) nos grupos sham, isquemia e reperfusão (I/R) e pré-condicionamento isquêmico (PCI)—análise de variância nos tempos de coleta: tempo 1 (p = 0,361); tempo 2 (p = 0,151); tempo 3 (p = 0,658); e tempo 4 (p = 0,789).

Palo Alto, CA, EUA) com um comprimento de onda de 535 nm. A concentração de TBARS obtida foi expressa em nmol/mg de proteína.⁽¹⁵⁾

Análise estatística

Os dados foram armazenados em planilha eletrônica (MS Excel 7.0; Microsoft Corporation) e a análise estatística realizada pelo programa *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A comparação entre os grupos foi feita por análise de variância. O nível de significância foi de 5% e os dados foram representados em média e desvio padrão da média.

Resultados

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação ao peso dos animais ($p = 0,822$) e ao tempo do procedimento cirúrgico ($p = 0,560$). Os achados da gasometria arterial, os valores da pressão parcial arterial de oxigênio (Figura 2) e da pressão parcial arterial de gás carbônico (Figura 3) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (sham, I/R e PCI) nos quatro tempos de coleta. A pressão arterial média apresentou queda gradativa e progressiva durante o período de observação em todos os grupos. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (sham, I/R e PCI) nos quatro momentos de medida (Figura 4). A quantificação dos produtos da peroxidação lipídica, por meio da determinação das TBARS analisadas nos quatro

grupos (controle, sham, I/R e PCI) não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,289$; Figura 5).

Discussão

A lesão pulmonar por I/R consiste em um fenômeno fisiopatológico complexo e multifatorial, necessitando a presença do oxigênio para sua gênese e manutenção, bem como a ativação de fatores vasculares, humorais e celulares. Esta condição ainda permanece como a principal causa de morbimortalidade no período pós-operatório do transplante pulmonar. Clinicamente, pode-se observar desde hipoxemia leve com poucos infiltrados ao radiograma de tórax, até a presença de um quadro semelhante à síndrome do desconforto respiratório agudo.⁽¹¹⁾ A I/R pode afetar diferentes órgãos e ocorrer em várias situações clínicas, tais como procedimentos cirúrgicos associados ao uso de circulação extracorpórea, terapia trombolítica, cirurgia de aorta, tromboembolotomia, hepatectomias e transplante de órgãos.⁽¹⁶⁾ Os principais responsáveis por esse dano tecidual são os radicais livres de oxigênio, também conhecidos como ERO. As células endoteliais e os leucócitos têm um importante papel nesse fenômeno, uma vez que a presença de ERO promove ativação e aderência leucocitária ao endotélio microvascular, resultando em maior produção destas moléculas e de enzimas citotóxicas. Além disso, em presença de hipóxia, ocorre aumento da permeabilidade endotelial com conseqüente formação de edema.^(1,17)

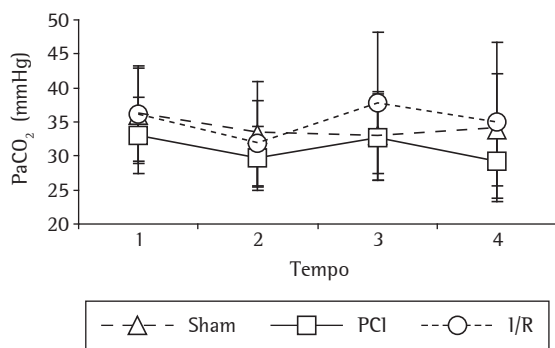


Figura 3 – Pressão parcial arterial de gás carbônico (PaCO_2) nos grupos sham, isquemia e reperfusão (I/R) e pré-condicionamento isquêmico (PCI)—análise de variância nos tempos de coleta: tempo 1 ($p = 0,430$); tempo 2 ($p = 0,388$); tempo 3 ($p = 0,225$); e tempo 4 ($p = 0,249$).

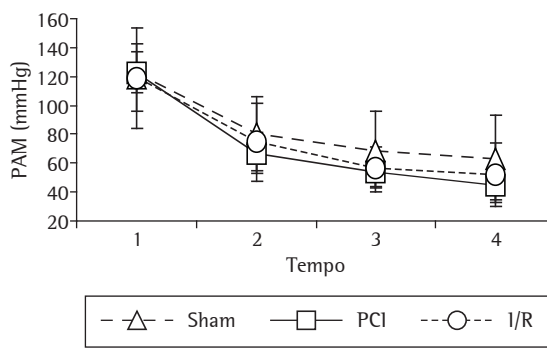


Figura 4—Pressão arterial média (PAM) sistêmica nos grupos sham, isquemia e reperfusão (I/R) e pré-condicionamento isquêmico (PCI)—análise de variância nos tempos de coleta: tempo 1 ($p = 0,922$); tempo 2 ($p = 0,387$); tempo 3 ($p = 0,156$); e tempo 4 ($p = 0,167$).

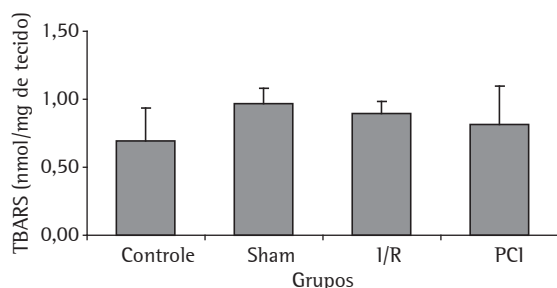


Figura 5 - Quantificação das *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) nos grupos controle, sham, isquemia e reperfusão (I/R) e pré-condicionamento isquêmico (PCI). Análise de variância: ausência de diferença estatisticamente significativa ($p = 0,289$).

Na maioria dos órgãos a isquemia é acompanhada de hipóxia tecidual até a reintrodução do oxigênio na reperfusão, sendo dessa forma a I/R equivalente a hipóxia-reoxigenação.⁽¹⁸⁾ Entretanto, o pulmão é considerado o único órgão que pode sofrer isquemia sem hipóxia, pois o oxigênio alveolar ajuda a manter o metabolismo aeróbico, evitando a última. Dessa forma, no pulmão, o estresse oxidativo resultante da isquemia deve ser diferenciado daquele resultante da hipóxia.⁽¹⁾

Hipóxia e, conseqüentemente, anóxia resultam em decréscimo na quantidade de trifosfato de adenosina intracelular e em aumento nos produtos de degradação daquele, como a hipoxantina, o que gera a produção de ERO quando o oxigênio é reintroduzido na reperfusão e/ou ventilação. Durante a isquemia esse fenômeno pode ocorrer no pulmão se a tensão de oxigênio alveolar cair abaixo de 7 mmHg.⁽³⁾ A ausência de fluxo sanguíneo pulmonar resulta em peroxidação lipídica mesmo com a presença de oxigênio. O mecanismo do estresse oxidativo é diferente do que ocorre durante a hipóxia-reoxigenação porque não está associado à diminuição de trifosfato de adenosina, podendo ocorrer mesmo durante o período de isquemia fria em um órgão acondicionado para transplante.⁽¹⁹⁾

O PCI tem sido estudado como uma forma de diminuir o dano da lesão de I/R por promover um condicionamento por meio de alterações metabólicas, enzimáticas e estruturais, com conseqüente proteção celular para uma posterior lesão de reperfusão. Esse efeito protetor deve-se ao que alguns autores têm chamado de tolerância à isquemia e

tolerância à reperfusão.⁽¹¹⁾ Como existem resultados contraditórios entre alguns estudos, não se pode estabelecer uma relação entre episódios repetidos de PCI e menor dano tecidual da lesão de I/R.^(20,21) Du et al. foram os primeiros a estudar a diminuição na formação de ERO em pulmões submetidos ao PCI em modelo de transplante unilateral em ratos.⁽²²⁾ O efeito do PCI na lesão de I/R pulmonar também foi demonstrado por outros autores em modelos animais de perfusão pulmonar isolada,^(20,23,24) I/R in situ⁽²⁵⁻²⁷⁾ e transplante pulmonar.^(22,28)

Utilizou-se um modelo experimental de lesão de I/R pulmonar em ratos, in situ, baseado em um modelo estabelecido na literatura e por nós utilizado previamente.⁽²⁹⁾ No presente estudo, realizou-se PCI com o clampeamento arterial pulmonar seletivo, sem oclusão brônquica e das veias pulmonares. O protocolo de PCI utilizado (5 min de isquemia seguido por 10 min de reperfusão), foi baseado nas observações de um estudo⁽²⁶⁾ no qual o PCI de 5 min em relação ao de 10 min resultou em uma melhor troca gasosa e melhor mecânica pulmonar, além da diminuição na expressão do fator de necrose tumoral alfa no lavado broncoalveolar de cães submetidos a lesão de I/R in situ. Além disso, Du et al. demonstraram que 5 min de PCI resultou em menor lesão de I/R em modelo de transplante pulmonar em ratos.⁽²²⁾ Utilizou-se no presente estudo o tempo de reperfusão de 90 min com base nos achados de outro estudo⁽³⁰⁾ que demonstrou em modelo in situ de I/R, por meio de quimioluminescência e de um sistema de monitoramento contínuo, que havia uma produção contínua e crescente de superóxido até os 90 min de reperfusão.

Nossos resultados não demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos na análise dos gases arteriais e na quantificação dos produtos de peroxidação lipídica pelo método TBARS. Esses resultados diferem dos achados de outros estudos^(22,26-28) em que foi observada a diminuição na lesão de I/R com o uso do PCI, porém corroboram os achados de outro estudo.⁽²³⁾ Dois estudos,^(25,26) que avaliaram o efeito do PCI através de modelo de I/R in situ demonstraram uma diminuição na lesão de I/R. No entanto, nestes estudos, o PCI foi realizado por meio do clampeamento hilar total, diferentemente do clampeamento arterial seletivo da artéria pulmonar esquerda que utilizamos. Em modelo de transplante pulmonar, o uso do PCI como uma forma de preservação pulmonar demonstrou benefício,

tanto em ratos⁽²²⁾ quanto em cães.⁽²⁸⁾ Entretanto, nesses estudos, o PCI foi realizado pelo clampeamento hilar total. Em modelo de perfusão isolada, um outro grupo de autores⁽²³⁾ observou o efeito do PCI em relação à complacência pulmonar e a troca gasosa por meio da parada da perfusão (de 5 ou 10 min) com a parada simultânea ou não da ventilação. Concluiu-se que houve diferença significativa, com uma melhor complacência pulmonar, apenas nos grupos submetidos à parada da perfusão e ventilação simultaneamente, porém sem diferenças nas trocas gasosas. Os resultados desse estudo são semelhantes aos que obtivemos, onde o PCI por clampeamento seletivo da artéria pulmonar não diminuiu a lesão de I/R pela análise da gasometria arterial e da peroxidação lipídica.

Em conclusão, os resultados do presente estudo mostram que o PCI isolado de 5 min por oclusão seletiva da artéria pulmonar em modelo de I/R in situ em ratos não foi capaz de atenuar a lesão de I/R por meio da análise dos gases arteriais e da quantificação dos produtos de peroxidação lipídica. Estudos futuros devem ser empreendidos para esclarecimento destes achados.

Referências

1. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):490-511.
2. de Perrot M, Keshavjee S. Lung preservation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;16(4):300-8.
3. 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;104(4):1075-83.
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;119(5):921-30.
5. Bertolotti A, Gómez 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;39(2):355-7.
6. Kohmann JC, Ruschel M, Madruga G, Castro M, Di Pietro D, Felicetti JC, et al. Efeito da prostaglandina E1 na viabilidade do pulmão de cadáver após transplante pulmonar unilateral em cães. *J Pneumol* 1994;20(Supl 3):145.
7. Kohmann JC, Silva UL, Madke G, Pilla ES, Felicetti JC, Camargo JJP, et al. Perfusão pulmonar anterógrada versus retrógrada na preservação pulmonar para transplante em modelo canino de viabilidade pulmonar pós-morte. *J Pneumol*. 1999;25(2):78-83.
8. Egan TM, Ulicny KS Jr, Lambert CJ Jr, Wilcox BR. Effect of a free radical scavenger on cadaver lung transplantation. *Ann Thorac Surg*. 1993;55(6):1453-9.
9. Itano H, Zhang W, Ritter JH, McCarthy TJ, Mohanakumar T, Patterson GA. Adenovirus-mediated gene transfer of human interleukin 10 ameliorates reperfusion injury of rat lung isografts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;120(5):947-56.
10. 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;23(2):242-51.
11. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2005;29(2):106-15.
12. Ambros JT, Herrero-Fresneda I, Borau OG, Boira JM. Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics. *Transpl Int*. 2007;20(3):219-29.
13. Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996. p. 1-35.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
15. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10.
16. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190(3):255-66.
17. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med*. 1991;91(3C):2S-13S.
18. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
19. Eckenhoff RG, Dodia C, Tan Z, Fisher AB. Oxygen-dependent reperfusion injury in the isolated rat lung. *J Appl Physiol*. 1992;72(4):1454-60.
20. Gasparri RI, Jannis NC, Flameng WJ, Lerut TE, Van Raemdonck DE. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbit. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;16(6):639-46.
21. Iliodromitis EK, Kremastinos DT, Katritsis DG, Papadopoulos CC, Hearse DJ. Multiple cycles of preconditioning cause loss of protection in open-chest rabbits. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(3):915-20.
22. Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant*. 1996;15(12):1258-67.
23. Featherstone RL, Chambers DJ, Kelly FJ. Ischemic preconditioning enhances recovery of isolated rat lungs after hypothermic preservation. *Ann Thorac Surg*. 2000;69(1):237-42.
24. Soncul H, Oz E, Kalaycioglu S. Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung. *Chest*. 1999;115(6):1672-7.
25. Li G, Chen S, Lu E, Hu T. Protective effects of ischemic preconditioning on lung ischemia reperfusion injury: an in-vivo rabbit study. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1999;47(1):38-41.
26. Friedrich I, Spillner J, Lu EX, Bartling B, Barnscheid M, Sablotzki A, et al. Ischemic pre-conditioning of 5 minutes but not of 10 minutes improves lung function after warm ischemia in a canine model. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20(9):985-95.

27. Markart P, Schmidt R, Ruppert C, Höres C, Silber RE, Börgermann J, et al. Ischemic and endotoxin pre-conditioning reduce lung reperfusion injury-induced surfactant alterations. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(10):1680-9.
28. Li G, Chen S, Lou W, Lu E. Protective effects of ischemic preconditioning on donor lung in canine lung transplantation. *Chest*. 1998;113(5):1356-9.
29. Castro MA, Madruga GS, Lima e Silva U, Bock P, Klein AB, Felicetti JC, et al. Quantificação dos produtos de peroxidação lipídica em modelo experimental de injúria de reperfusão pulmonar em ratos. *J Pneumol*. 1996;22(2):65-8.
30. Midorikawa J, Maehara K, Yaoita H, Watanabe T, Ohtani H, Ushiroda S, et al. Continuous observation of superoxide generation in an in-situ ischemia-reperfusion rat lung model. *Jpn Circ J*. 2001;65(3):207-12.