

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS**

**FACULDADE DE MEDICINA - FAMED**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS**

**UTILIZAÇÃO DE PERFLUOROCARBONO VAPORIZADO COMO MÉTODO  
DE PROTEÇÃO PULMONAR EM DIFERENTES MODELOS ANIMAIS DE  
LESÃO PULMONAR**

**RENATA SALATTI FERRARI**

**PORTO ALEGRE**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS**

**FACULDADE DE MEDICINA - FAMED**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS**

**UTILIZAÇÃO DE PERFLUOROCARBONO VAPORIZADO COMO MÉTODO  
DE PROTEÇÃO PULMONAR EM DIFERENTES MODELOS ANIMAIS DE  
LESÃO PULMONAR**

**RENATA SALATTI FERRARI**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Pneumológicas,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
como requisito parcial para o título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Feijó Andrade

**Porto Alegre**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

FERRARI, RENATA SALATTI

UTILIZAÇÃO DE PERFLUOROCARBONO VAPORIZADO COMO  
MÉTODO DE PROTEÇÃO PULMONAR EM DIFERENTES MODELOS  
ANIMAIS DE LESÃO PULMONAR / RENATA SALATTI FERRARI. -  
- 2017.  
134 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, 2017.

1. Isquemia/ reperfusão. 2. Perfluorocarbono. 3.  
Transplante pulmonar. 4. Estresse Oxidativo. 5.  
Mediadores Inflamatórios. I. ANDRADE, CRISTIANO FEIJÓ,  
orient. II. Título.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a meus pais, Maria da Graça e Renato, os quais sempre buscaram me incentivar de maneira leiga, mas da maneira deles. A eles principalmente, pois foram a base de tudo, incentivando, dando apoio, amor incondicional e nunca medindo esforços para minha educação. Se hoje estou aqui, foi porque contei com o apoio de vocês.

Ao Thyago, pelo companheirismo nesta e em outras jornadas, por ser um porto seguro sempre e pela incansável parceria destes anos todos.

E ao nosso Joaquim, ao qual abdiquei várias horas, mas com o objetivo de buscar um futuro melhor para ti meu pequeno.

A todos, meu muito obrigada. Amo vocês !

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Cristiano Feijó Andrade, meu orientador, pela grandiosa paciência, pelos ensinamentos e pela "parceria" desde a escrita do projeto, durante toda a fase do experimento, sempre acreditando e incentivando a realização deste trabalho.

Ao Professor Alexandre Simões Dias, que mesmo não participando deste trabalho, foi a pessoa que me inseriu na pesquisa, iniciando como IC a vários anos atrás, na qual esse caminho todo, hoje resulta em uma tese de doutorado.

Aos grandes colaboradores e amigos que o doutorado me presenteou: Leonardo Rocha e Lucas Lisi, sem vocês esse trabalho não teria sido realizado, agradeço pela disponibilidade que sempre tiveram e pela dedicação principalmente na fase 1 deste projeto, pois foi a mais exaustiva sem dúvidas. Tudo isso fez com que essa tese hoje, seja de vocês também. Muito Obrigada!

Ao José Ignacio Gonzalez Solari, a Aline Morás Borges, a Graziela, pela paciência, perseverança e disponibilidade no auxílio das análises e discussões durante a realização das técnicas.

A Marta e toda equipe da Unidade de Experimentação Animal, pelo apoio durante a fase de testes da vaporização, durante todos os experimentos e pelo pronto auxílio sempre que necessário.

A todos vocês, muito obrigada!

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS .....	5
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	8
LISTA DE FIGURAS .....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT .....	14
1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	20
2.1 Lesão de Isquemia e Reperfusão.....	20
2.2 Estresse oxidativo e lesão de isquemia-reperfusão .....	21
2.3 Estresse oxidativo e lesão de isquemia-reperfusão pulmonar .....	23
2.4 Efeitos sistêmicos da lesão de isquemia-reperfusão.....	26
2.5 Sistema de defesa antioxidante .....	27
2.6 Endotélio .....	28
2.7 Mediadores Inflamatórios .....	29
2.8 Fator de Transcrição Nuclear kappa B.....	32
2.9 Óxido Nítrico.....	33
2.10 Ativação leucocitária .....	34

2.11 Apoptose e lesão de isquemia-reperfusão pulmonar .....	35
2.12 Caspases .....	36
2.13 Prevenção e Tratamento da lesão IR pulmonar .....	37
2.14 Perfluorocarbonos .....	40
3. JUSTIFICATIVA .....	42
4. OBJETIVOS .....	44
4.1 OBJETIVO GERAL .....	44
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
5. Referências Bibliográficas .....	45
6. ARTIGO I - .....	59
7. ARTIGO 2 .....	100
8. ARTIGO 3 .....	109
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	134

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**ATP - Trifosfato de Adenosina**

**ADP - Difosfato de Adenosina**

**CAT - Catalase**

**CEC - Circulação Extracorpórea**

**CO<sub>2</sub> - Gás carbônico**

**ERO - Espécies Reativas de Oxigênio**

**GPX - Glutathione Peroxidase**

**IL-17 - Interleucina - 17**

**IR - Lesão de Isquemia-Reperfusão**

**LPD - Low Potassium Dextran**

**MMP-9 - Metaloproteinase da Matriz-9 (MMP-9)**

**MAPK - Proteína Kinase**

**NAS - N-acetilcisteína**

**NADP - Dinucleotídeo Fosfato de Nicotinamida**

**NO - Óxido Nítrico**

**NF-κB - Fator de Transcrição Nuclear Kappa Beta**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio**

**OH - Radicais Hidroxila**



**$O_2^-$  - Radical Superóxido**

**$O_2$  - Oxigênio**

**$OONO^{\cdot}$  - Peroxinitrito**

**PAF - Fator de Ativação Plaquetário**

**PFC - Perfluorocarbonos**

**PGE - Prostaglandinas**

**PGI - Prostaciclina**

**$ROO^{\cdot}$  - Radicais Peroxil**

**SOD - Superóxido Dismutase**

**TLR - Toll Like Receptores**

**TNF-  $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral-  $\alpha$**

**$TXA_2$  - Tromboxano**

**VLP - Ventilação Líquida Parcial**

## LISTA DE FIGURAS

### **Artigo 1: OXIDATIVE STRESS AND LUNG ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY**

Figure 1: Formation of oxygen free radicals during lung ischemia and reperfusion injury..... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 2: Activation of the immune response and trafficking of inflammatory cells in the diseased organ during reperfusion. ... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 3: The transcription of nuclear NF- $\kappa$ B is regulated by the inhibitory action of the inhibitor protein I $\kappa$ B during ischemia-reperfusion injury**Erro! Indicador não definido.**

Figure 4: Release of cytochrome C from mitochondria triggers the activation of caspase 9, which cleaves caspases 3 and 6, leading to apoptosis .....**Erro! Indicador não definido.**

### **Artigo 2: VAPORIZED PERFLUOROCARBON REDUCES OXIDATIVE STRESS DURING COLD ISCHEMIC TIME IN LUNG PRESERVATION**

Figura - Fotomicrografias de amostras do tecido pulmonar após 24 horas de isquemia fria. ....- 105

### **Artigo 3: VAPORIZED PERFLUOROCARBON REDUCES INFLAMMATORY ACTIVITY DURING LUNG ISCHEMIA REPERFUSION INJURY VAPORIZED PERFLUOROCARBON IN LUNG INJURY**

Figure 1 - Expression of NF- $\kappa$ B in lung tissue. ....- 126

Figure 2 - Expression of IL-6 in lung tissue .....- 127

Figure 3: Expression of caspase 3 in lung tissue .....	128
Figure 4: Expression of caspase 3 in lung tissue by the immunohistochemical technique .....	129
Figure 5: Expression of iNOS in lung tissue.....	130
Figure 6: Expression of SOD in lung tissue.....	131
Figure 7: Expression of SOD in lung tissue. ....	132

## RESUMO

A lesão de isquemia-reperfusão (IR) está diretamente relacionada à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), lesão das células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular e ativação de neutrófilos e plaquetas, citocinas e o sistema complemento. Diversos estudos confirmaram a destruição dos metabólitos tóxicos de oxigênio produzidos e o seu papel na fisiopatologia de diferentes processos, como intoxicação por oxigênio, inflamação e lesão isquêmica. Devido aos diferentes graus de danos nos tecidos resultantes do processo de isquemia e subsequente reperfusão, vários estudos em modelos animais têm-se centrado na prevenção de lesões por IR e métodos de proteção pulmonar.

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 antiinflamatória e anti-oxidante. Estas características fazem dos PFCs potenciais substâncias que podem proteger os pulmões em diferentes contextos do transplante pulmonar.

Primeiramente, estudamos um modelo de preservação pulmonar em ratos utilizando diferentes tempos de isquemia fria e verificando qual o potencial de preservação pulmonar iríamos obter com a utilização do PFC vaporizado como terapia adjuvante para melhorar a viabilidade do órgão comparado com a utilização exclusiva da solução de preservação pulmonar convencional (baixa concentração de potássio e dextran - LPD) . Este primeiro estudo envolveu 8 grupos, os pulmões foram preservados por 3, 6, 12 e 24 horas. Usando uma dose de 7ml/kg de PFC, houve um aumento significativo na atividade antioxidante da enzima superóxido dismutase (SOD) e uma melhora histológica nos pulmões do animais tratados com PFC vaporizado.

Então, verificando que o PFC possuía benefícios na preservação pulmonar, utilizamos um modelo experimental de isquemia e reperfusão em

ratos. Analisamos os efeitos do PFC na morte celular, na resposta inflamatória e no estresse oxidativo. Observou-se que o uso de PFC vaporizado reduziu significativamente a expressão do NF- $\kappa$ B, interleucina-6, caspase 3, iNOS, elevou os níveis de SOD, bem como reduziu a lesão pulmonar na análise histológica.

Em conclusão, o uso de PFC vaporizado como adjuvante à estratégia de preservação atual, mostrou maior proteção ao enxerto e reduziu os efeitos deletérios ocasionados pela lesão de isquemia-reperfusão.

## ABSTRACT

Ischemia-reperfusion (IR) injury is directly related to the formation of reactive oxygen species (ROS), endothelial cell injury, increased vascular permeability, and activation of neutrophils and platelets, cytokines and complement system. Several studies have confirmed the harmful effects of the oxygen metabolites produced and their role in the pathophysiology of different processes, such as oxygen poisoning, inflammation and ischemic injury. Due to the different degrees of tissue damage resulting from the process of ischemia and subsequent reperfusion, several studies in animal models have focused on the prevention of IR injury and methods of lung protection.

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

Firstly, we studied a model of pulmonary preservation in rats using different times of cold ischemia and verifying the potential effects of vaporized PFC on pulmonary preservation as an adjuvant substance to improve organ viability. We used in one group exclusively conventional lung preservation solution (Low concentration of potassium and dextran - LPD) and in the other the association of vaporized PFC and LPD. This first study involved 8 groups, the lungs were preserved for 3, 6, 12 and 24 hours. Using a 7ml / kg dose of PFC, there was a significant increase in the antioxidant activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) and a histological improvement in the lungs of animals treated with vaporized PFC.

Therefore, by checking that PFC had benefits in lung preservation, we used an experimental model of ischemia and reperfusion in rats. We analyzed the effects of PFC on cell death, inflammatory response and oxidative stress. It was observed that the use of vaporized PFC significantly reduced the

expression of NF- $\kappa$ B, interleukin-6, caspase 3, iNOS, elevated SOD levels, as well as reduced histological lung injury score.

In conclusion, the use of vaporized PFC as adjuvant to the current preservation strategy improved both graft preservation and reduced deleterious effects caused by ischemia-reperfusion injury.

## 1. INTRODUÇÃO

O transplante pulmonar pode apresentar várias complicações no período pós-operatório precoce, como injúria de isquemia/reperfusão (IR), atelectasia, rejeição e infecção. Avanços nas técnicas de preservação pulmonar têm reduzido a incidência da disfunção precoce do enxerto, entretanto os mecanismos que envolvem a injúria 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. A preservação pulmonar para o transplante realizada 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*), 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 (3).

Várias substâncias e métodos de preservação pulmonar têm sido estudados, dentre elas encontram-se os perfluorocarbonos (PFCs) (4).

Os PFCs são substâncias que possuem baixa tensão superficial, alta densidade, são insolúveis em água, além de permitirem alta difusão de oxigênio (O<sub>2</sub>) e gás carbônico (CO<sub>2</sub>) (5). 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 PFCs 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 PFC em modelos de transplante pulmonar tem sido pouco estudada na literatura, apresentando resultados conflitantes, quanto a sua efetividade (10-14). Itano et al (15), utilizaram PFC após o transplante pulmonar enquanto que Loehe et al (4) 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.

Em estudo realizado por nosso grupo, demonstramos que enxertos extraídos após 3 horas de isquemia normotérmica pós-parada cardio-circulatória (5) e que receberam PFC após a reperfusão do pulmão transplantado, apresentavam-se viáveis até 6 horas de reperfusão. 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 (16).

Embora a ventilação líquida parcial (VLP) represente um avanço considerável devido a facilidade na administração de PFCs, em comparação com a ventilação líquida total, encher os pulmões com estas substâncias pode levar a hipóxia transitória, perturbações da hemodinâmica e barotrauma. Além disso, estudos clínicos conseguiram demonstrar a capacidade da VLP para diminuir a mortalidade na insuficiência respiratória aguda. Devido a essas observações, os pesquisadores desenvolveram formas alternativas de administração de perfluorocarbonetos, incluindo nebulização e vaporização, com promissores resultados em estudos experimentais (17, 18).

Nesta última abordagem, um PFC com pressão de vapor elevada, pode ser administrado por meio de vaporizadores de anestesia convencionais, uma

vez que a temperatura corpo, o PFC é mantido no estado de vapor, e nenhuma fase líquida é estabelecida nos pulmões, tornando esta modalidade atraente para o ambiente clínico. No entanto, poucos estudos têm abordado a vaporização durante a lesão de IR pulmonar ocasionada no transplante pulmonar e comparando esta nova abordagem com a VLP e ventilação mecânica convencional (18, 19).

Segundo Yamane et al (20), a resposta inflamatória pós-transplante depende do tempo de isquemia. Há 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 quimiocinas tendem a ter um aumento da sua expressão em 24 horas quando comparados a 6 horas de isquemia fria, sendo muitos destes genes relacionados ao processo de apoptose.

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 (17, 20). A diferenciação da função pulmonar pode ser dependente destes processos como o estabelecido por Quadri et al (17), 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 lesão por reperfusão e melhorando a função pulmonar (17).

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 uma resposta celular mais organizada através da ativação do sistema do complemento e linfócitos T<sup>4</sup>. Ambas as fases contribuem para uma exacerbação da resposta inflamatória resultando em morte celular principalmente devido a estimulação das células apoptóticas (3, 19, 20). Esta indução a resposta inflamatória e a apoptose pode ser mediada pelo fator de transcrição nuclear kappa beta (NF-kB), isto evidencia-se no estudo de Ishiyama et al (21), o qual demonstrou que a inibição do NF-kB com terapia gênica preveniu a indução da apoptose e diminuiu a lesão de IR em modelo experimental de transplante pulmonar em roedores. Sugerindo assim que o NF-kB seria o fator de responsável pela ativação da lesão pulmonar pós-transplante por atuar como fator promotor da morte celular por vias apoptóticas (17). Na cascata de sinalização do estímulo inflamatório, o NF-kB 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).

Estudo recente demonstrou que o tratamento com PFC vaporizado em modelo de lesão pulmonar foi capaz de reduzir a lesão e também reduzir os níveis de metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9) o qual pode ser um mecanismo potencial pelo qual o PFC vaporizado reduz o grau de lesão pulmonar (20).

Segundo Zhao (22), a vaporização de PFC também melhora a oxigenação pulmonar e atenua a lesão pulmonar em modelo de síndrome do desconforto respiratório.

Sabendo que a lesão de IR está presente durante o transplante pulmonar e que apresenta importante contribuição no processo de rejeição do órgão transplantado, torna-se necessário a pesquisa de algum método que minimize os danos causados pela lesão de IR e que contribua para a preservação pulmonar aumentando assim a sua viabilidade.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Lesão de Isquemia e Reperfusão**

O dano tecidual de determinado órgão quando submetido à isquemia, é agravado no momento da sua reoxigenação pela reperfusão tecidual, a qual é considerada mais deletéria que a isquemia em si (23). Esse mecanismo de lesão tecidual recebe o nome de lesão de reperfusão ou lesão de isquemia-reperfusão (IR). Consiste em um fenômeno fisiopatológico complexo, necessitando da presença do oxigênio para sua gênese, bem como manutenção e ativação de fatores vasculares, humorais e celulares.

Em sua manifestação clássica, a oclusão do suprimento arterial é causada por um êmbolo e a isquemia resulta em um grave desequilíbrio entre a oferta e a demanda metabólica, causando hipóxia tecidual. Enquanto isto durante a reperfusão, a restauração do fluxo sanguíneo é freqüentemente associada a uma exacerbação da lesão tecidual e uma intensa resposta inflamatória (24).

A isquemia atinge as células e desencadeia uma série de eventos, devido a ausência de oxigênio, resultando em diferentes intensidades de danos celulares e conseqüente ativação de enzimas citotóxicas, culminando finalmente em morte celular.

A privação de oxigênio faz com que não ocorra a fosforilação oxidativa na mitocôndria, assim, a glicólise anaeróbica torna-se o meio de obtenção de energia, porém, não é adequada para a reposição do trifosfato de adenosina (ATP) consumido. Esse déficit de ATP prejudica o transporte ativo de íons através da membrana levando a um acúmulo de sódio e, por difusão, água no interior da célula, com conseqüente edema. Esse desequilíbrio ocorre também no interior das organelas, levando ao edema e desintegração das mitocôndrias, expansão e formação de vesículas no retículo endoplasmático. A ruptura de lisossomos e liberação de enzimas contidas no seu interior representam os eventos finais antes da morte celular (25, 26).

A lesão de reperfusão apresenta relação direta com a formação de espécies reativas de oxigênio (27), ativação de neutrófilos e plaquetas, lesão da célula endotelial, aumento da permeabilidade vascular, ativação de citocinas e a ativação do sistema complemento (28).

Quando expostas a hipóxia, as células endoteliais alteram seus citoesqueletos e sua morfologia, formando pequenos poros intercelulares. A presença destes poros determina um aumento da permeabilidade do endotélio, com formação de edema tecidual (29). A piora da perfusão torna-se potencializada por um desequilíbrio na produção de fatores vasoconstritores e vasodilatadores. O endotélio hipóxico tem aumento na produção de potentes vasoconstritores (endotelinas tipos 1, 2 e 3) e diminuição na produção de vasodilatadores (óxido nítrico - NO) (30).

Essas alterações iniciadas na isquemia, sobretudo sobre as células endoteliais e leucócitos, não só determinam lesão tecidual, mas também criam condições que favorecem futuras lesões com a ocorrência da reperfusão.

Outro efeito já demonstrado após um período de isquemia é a falência de reperfusão de determinados segmentos da microcirculação, gerando uma heterogeneidade na distribuição do fluxo sanguíneo, com hipóxia tecidual focal. Esse fenômeno, denominado não-reperfusão (no-reflow), constitui-se em mais um mecanismo de lesão tecidual após a restauração da reperfusão do tecido (31).

Devido as complicações induzidas pela lesão de IR, bem como sua elevada morbidade e mortalidade, diversos estudos investigam a fisiopatologia da lesão de IR na tentativa de prevenir ou reverter seus efeitos deletérios.

## **2.2 Estresse oxidativo e lesão de isquemia-reperfusão**

O estresse oxidativo possui papel na patogenia de várias condições clínicas como doenças malignas, diabetes *mellitus*, aterosclerose, inflamação

crônica, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e lesão de IR (32).

Tem-se demonstrado que há diferentes vias de produção das ERO (33), destacando-se a via da xantina-oxidase como fonte primária de produção na maioria dos órgãos com vascularização sistêmica (34). Na matriz mitocondrial, através da cadeia de transporte de elétrons também ocorre a formação de ERO pela redução do oxigênio molecular a radical superóxido ( $O_2^-$ ) (35).

Granger *et al.* publicaram um dos primeiros estudos que demonstrou a participação do  $O_2^-$  na lesão isquêmica através de um modelo de isquemia intestinal em gatos (36).

Quando um tecido é submetido à isquemia, uma seqüência de reações químicas é iniciada e apesar de não se identificar apenas um evento crítico responsável pelo dano tecidual, a maioria dos estudos demonstra que a depleção dos estoques de energia e o acúmulo de metabólitos tóxicos do oxigênio (estresse oxidativo) podem contribuir para a morte celular. Paradoxalmente, a reperfusão enquanto necessária restaura rapidamente o suprimento de energia, removendo metabólitos tóxicos e evitando a falência do órgão, no entanto ela também contribui e amplifica os mecanismos envolvidos no dano tecidual isquêmico (28).

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 (37), 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 (28, 38).

A xantina-desidrogenase utiliza o dinucleotídeo fosfato de nicotinamida (NADP) ao oxigênio, como receptor de elétron durante a oxidação dos metabólitos das purinas (hipoxantina, xantina). A xantina-oxidase depende do oxigênio para a metabolização da hipoxantina e, quando este é fornecido pela reperfusão (reoxigenação), formam-se as ERO, moléculas com grande capacidade de lesão tecidual (28).

A NADPH-oxidase, uma enzima expressa em praticamente todas as células inflamatórias, contribui para a formação do citotóxico peroxinitrito ( $\text{OONO}^\cdot$ ). Além disso, o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) derivado da dismutação do  $\text{O}_2$  dá origem a radicais hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) altamente tóxicos através da reação de Haber-Weiss, facilitada pelo aumento da disponibilidade de ferro livre durante a isquemia (39).

Experimentos *in vivo* sugerem que a lesão de IR, em corações de ratos submetidos à sobrecarga de Ferro ( $\text{Fe}^{+++}$ ), possa estar relacionada à produção de ERO via reação de Haber-Weiss (40).

A importância dos radicais de oxigênio na fisiopatologia da lesão de IR foi demonstrada quando a injeção de captadores de radicais livres ou enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase(CAT) ou glutathione peroxidase(GPX), impediram os danos que ocorrem durante a reperfusão (41, 42).

Vários estudos confirmaram o poder destrutivo dos metabólitos tóxicos derivados do oxigênio e o seu papel na fisiopatologia de diferentes processos tais como intoxicação pelo oxigênio, inflamação e lesão isquêmica (40, 46, 47, (38, 43, 44).

### **2.3 Estresse oxidativo e lesão de isquemia-reperfusão pulmonar**

Os mecanismos da lesão de IR no parênquima pulmonar guardam, entretanto, pontos comuns com a lesão de reperfusão em outros órgãos,

incluindo uma participação significativa de ROS, influxo intracelular de cálcio, lesão da célula endotelial, seqüestro e ativação de leucócitos na circulação pulmonar, ativação do sistema complemento, liberação de mediadores inflamatórios incluindo metabólitos do ácido araquidônico.

A lesão de IR pulmonar pode ocorrer em decorrência de um trauma, aterosclerose, embolia pulmonar e procedimentos cirúrgicos, como a circulação extracorpórea (CEC) e o transplante de pulmão (45). Sendo este último a situação mais estudada devido a estar diretamente relacionado à incidência de disfunção precoce do enxerto e ser responsável por até 20% de mortalidade no período pós-operatório precoce (46, 47).

A lesão pulmonar induzida por IR ocorre com freqüência no ambiente do transplante pulmonar e é caracterizada por edema, hipoxemia e infiltração pulmonar.

Sabendo que a lesão dos tecidos não está limitada apenas à isquemia, podendo se estender ou se agravar, com a reperfusão, o seu reconhecimento é importante para que se possa proceder à reversão da isquemia, ponto fundamental para a manutenção da viabilidade do tecido, de modo menos lesivo (48).

A reperfusão pulmonar também causa alterações significativas na circulação pulmonar. Tanto em modelos animais quanto em órgãos isolados, verifica-se um aumento da resistência vascular pulmonar. Isso ocorre sobretudo nas vênulas pós-capilares, aumentando a pressão hidrostática e favorecendo a formação de edema facilitado pelo aumento da permeabilidade capilar por lesão endotelial. As ROS possuem um papel fundamental no desenvolvimento da lesão de IR pulmonar (49) (50), caracterizada pelo aumento das ROS e de outros radicais livres, acarretando em um papel crucial na sucessão de eventos que levam à falência pulmonar (51) .

O fenômeno IR ocorre no coração, fígado, rim, intestino, sistema nervoso central, músculo esquelético, entre outros órgãos (32). Nesses órgãos



a isquemia é acompanhada de anóxia tecidual até a reintrodução do oxigênio na reperfusão, sendo, dessa forma, a IR equivalente a anóxia-reoxigenação. 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 (52).

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 IR através da ativação de fatores inflamatórios (52, 53).

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 reperfusão e/ou ventilação. Durante a isquemia, esse fenômeno pode ocorrer no pulmão se a tensão de oxigênio alveolar cair abaixo de 7 mmHg (54, 55). 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 (56).

Nos pulmões, as ERO estão relacionadas à ativação de processos inflamatórios por meio de fatores de transcrição, tais como o NF-kB, levando ao remodelamento de cromatina e à expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios (57, 58). A produção de ERO intracelulares têm sido observada em vários tipos celulares do tecido pulmonar, incluindo células endoteliais, epiteliais alveolares do tipo II, células claras, epiteliais ciliadas e macrófagos alveolares (59).

Acredita-se que a lesão de IR pulmonar seja decorrente de um aumento das ERO, as quais desencadeiam uma resposta do enxerto resultando em uma

ativação da resposta imune adaptativa (rejeição aguda) por meio da ativação de células apresentadoras de antígeno (60).

#### **2.4 Efeitos sistêmicos da lesão de isquemia-reperfusão**

A lesão de IR e a falência de múltiplos órgãos contribui significativamente para a mortalidade e morbidade pós-operatória, e a reperfusão induz o estresse oxidativo que desempenha um papel fundamental nesta patologia. (61) A lesão de IR pulmonar induz a efeitos sistêmicos principalmente no fígado e coração, e é caracterizada pelo seqüestro de neutrófilos e liberação de quantidades significativas de ROS na circulação (62, 63).

No entanto, o sistema pulmonar também pode sofrer conseqüências da IR de tecidos localizados à distância, a exposição de um único órgão a IR pode posteriormente causar a ativação inflamatória em outros, o que leva a falha em múltiplos sistemas. É importante ressaltar que as síndromes isquêmicas são um grupo heterogêneo de condições, embora haja algumas semelhanças nas respostas biológicas entre estas síndromes que ocorrem em diferentes órgãos, existem diferenças importantes entre uma redução na perfusão sistêmica, por exemplo durante o choque, em comparação com a isquemia regional e reperfusão de um único órgão (64).

Durante a lesão de IR no fígado ou rins, a ativação de respostas inflamatórias intestinais desencadeia uma sequência de eventos que leva a a falha de múltiplos órgãos. A IR de órgãos periféricos (como o fígado) resulta na ativação de células intestinais de Paneth, e posterior liberação de citocinas tais como interleucina 17 (IL-17), causando uma falha de outros sistemas, como por exemplo o sistema pulmonar (65, 66).

As respostas inflamatórias sistêmicas da IR mesentérica representam um importante modelo de doença grave, porque os déficits da mucosa

intestinal parecem ser fundamentais na iniciação e propagação de falência de múltiplos órgãos (67).

Em estudo de Mura et al, quase 50% dos animais do grupo IR morreram durante o período experimental de 4h. Os efeitos combinados da IR intestinal, procedimento cirúrgico, aplicação de alta concentração de oxigênio e ventilação mecânica pode ser responsável por essa alta taxa de mortalidade em animais de pequeno porte. Neste modelo, o órgão remoto mais gravemente ferido é geralmente do pulmão, e um estudo clínico recente confirmou que a disfunção respiratória após lesões traumáticas é um evento obrigatório que precede a falha do coração, rim e fígado (26, 68).

## **2.5 Sistema de defesa antioxidante**

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato de maneira enzimático ou não enzimático (69).

A defesa do organismo contra as ERO vai desde prevenção da formação das ERO, interceptação dos radicais formados ao reparo das células.

As enzimas que controlam os níveis de ERO são: Glutathione peroxidase (GPx), Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT), levando a interceptação e a desativação das ERO, sendo neutralizadas de forma a impedir a oxidação posterior de outras moléculas. A neutralização final de um composto com um ou mais elétrons não emparelhados consiste na formação de outro produto não radical. O interceptador (antioxidante) mais eficiente deve combinar propriedades ótimas, as quais reagem com radicais livres (70) iniciais, tais como, radicais peroxil ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) e, posteriormente, interagem com compostos hidrossolúveis para a sua própria regeneração (71).

Os compostos hidrossolúveis transferem a função radical para longe do sítio-alvo potencial e são chamados *scavengers* de RL. A combinação de uma substância com um RL leva à formação de um não radical ou um radical menos lesivo como, por exemplo, tocoferóis e carotenóides (71).

A terapia antioxidante pode ser feita pela reposição de antioxidantes endógenos, como superóxido dismutase recombinante (72), pela suplementação exógena com agentes com propriedades antioxidantes, como a N- acetilcisteína (73, 74).

A utilização de antioxidantes em modelos animais de lesão pulmonar tem sido pouco explorada em estudos experimentais e clínicos, tais como a utilização da NAC (73), a qual demonstra ser um importante potencial terapêutico a ser utilizado na lesão de IR (75).

## 2.6 Endotélio

O endotélio é a principal fonte de ERO durante a isquemia pulmonar não hipóxica através da ativação da NADPH oxidase. Esse complexo enzimático é também encontrado em outras células pulmonares, mas sua concentração é mais evidente nos neutrófilos, monócitos e macrófagos alveolares. 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  $O_2$  molecular a  $(O_2^-)$ , 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  $H_2O_2$  em reação catalisada pela SOD. Compostos oxidantes são produzidos também através de enzimas contidas em grânulos intracelulares. Os grânulos azurofílicos liberam a enzima mieloperoxidase (37) 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 (76).

Phan et al. sugeriram, através de estudo com cultura de células endoteliais, que estas células podem ter uma participação mais ativa na agressão pulmonar (77).

Baseando-se em estudos prévios que demonstraram a presença da enzima xantina-desidrogenase nas células endoteliais e a capacidade das mesmas em liberarem ERO, esses autores estudaram o efeito da presença de neutrófilos ativados em contato com essas células. Eles demonstraram que os neutrófilos ativados induzem a conversão da xantina-desidrogenase em xantina-oxidase no endotélio (78).

## **2.7 Mediadores Inflamatórios**

Alguns mediadores inflamatórios liberados como consequência da reperfusão de um órgão ou de uma região, podem ativar células endoteliais em órgãos distantes que não foram expostos ao insulto isquêmico, mas em decorrência da lesão de reperfusão acabam sendo lesionados.

Além disso, a lesão de reperfusão é caracterizada por respostas auto-imunes, incluindo o reconhecimento de anticorpos naturais de neoantígenos e subsequente ativação do sistema de complemento (auto-imunidade). Apesar do fato que a IR tipicamente ocorre num ambiente estéril, a ativação da resposta imune inata e adaptativa ocorre e contribui para a lesão, incluindo a ativação de receptores de reconhecimento de padrões, tais como os Toll Like Receptores (TLR) e tráfico de células inflamatórias no órgão doente (79).

Por exemplo, a ligação aos TLR conduz à ativação de vias de sinalização, incluindo o NF- $\kappa$ B, ativação da proteína quinase (MAPK) e vias do interferon tipo I, que resulta na indução de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, sendo que estes receptores também podem ser ativados por

moléculas endógenas, na ausência de compostos microbianos, particularmente no contexto de dano ou morte celular, como ocorre durante a IR (79).

Especificamente, a ativação do TLR-4, pode ser agravada pelo estresse oxidativo, que é gerado pela IR, e é conhecido pelas células inflamatórias principais como um aumento da capacidade de resposta a estímulos subsequentes. Macrófagos alveolares de roedores submetidos a choque hemorrágico e ressuscitação expressam níveis aumentados de TLR4, efeito que foi inibido por adição ao antioxidante NAC com o fluido de reanimação.

Andrade et al. examinaram os níveis de expressão de mRNA de TLRs em tecidos de pulmão colhidos durante a IR no transplante pulmonar humano. Nos pulmões de doadores hipotermicamente conservados, os níveis de mRNA da maioria dos TLRs correlaciona-se com os níveis de mRNA de citocinas (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 e IFNC). Estas observações sugerem que as respostas inflamatórias no órgão do doador pode afetar a expressão e a atividade do gene TLR, como alternativa, os níveis de expressão e ativação de TLR pode contribuir para a regulação da expressão gênica de citocinas (80).

O TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-  $\alpha$ ), as ROS (27) e a interleucina-6 (IL-6), estão implicados no dano tecidual que ocorre durante a IR (11), devido ao fato de serem moléculas tóxicas que alteram as proteínas celulares, lipídios e ácidos ribonucléicos, levando a disfunção ou morte celular.

Contribuindo ainda mais para o dano tecidual, a piora da perfusão é potencializada por um desequilíbrio na produção de fatores vasoconstritores e vasodilatadores. O endotélio hipóxico tem aumento na produção de potentes vasoconstritores (endotelinas tipos 1, 2 e 3) e diminuição na produção de vasodilatadores (NO) (30).

O dano celular gerado pelas ERO na membrana lipídica promove a ativação da fosfolipase  $A_2$ , induzindo a produção do fator de ativação plaquetário (PAF) que promove a mobilização do ácido araquidônico dos

fosfolípidios da parede celular. O ácido araquidônico é o substrato de numerosas enzimas e no pulmão é primeiramente metabolizado por duas vias: a da cicloxigenase e a da 5-lipoxigenase, gerando mediadores inflamatórios. A via da cicloxigenase produz prostaglandinas (PGE<sub>1</sub> e PGI<sub>2</sub>) e tromboxano (TXA<sub>2</sub>); e a via da 5-lipoxigenase gera leucotrienos tais como leucotrieno B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub> (81, 82).

A resistência vascular pulmonar depende da interação entre vasoconstritores e vasodilatadores. A maioria dos metabólitos do ácido araquidônico são resultantes das células endoteliais e contribuem para manter a baixa resistência vascular no pulmão. Os efeitos das prostaglandinas e dos tromboxanos são antagônicos. A prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) é um broncodilatador, vasodilatador pulmonar e impede a agregação de plaquetas, enquanto que o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) é um bronco e vasoconstritor e induz agregação plaquetária (82). As prostaglandinas (PGE<sub>1</sub> e PGI<sub>2</sub>) estão associadas aos seguintes efeitos: vasodilatação e broncodilatação; inibição de agregação plaquetária, sequestro e aderência leucocitária; além de supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) (37, 83, 84).

O PAF pode ser liberado de várias células como macrófagos, plaquetas, mastócitos, células endoteliais e neutrófilos, sendo responsável pela ativação leucocitária, agregação plaquetária, liberação de citocinas e expressão de moléculas de adesão (85). A PAF acetilhidrolase é responsável pela degradação e regulação da atividade do PAF. Níveis elevados dessa enzima foram encontrados no lavado broncoalveolar de pacientes com SARA (86). Além disso, tem sido observado, que esta substância, quando adicionada a uma solução de preservação pulmonar em modelo de perfusão isolada tem a capacidade de reduzir a permeabilidade capilar pulmonar (87).

Os leucotrienos, produtos do metabolismo do ácido araquidônico pela via da 5-lipoxigenase são divididos em duas classes: os cisteínicos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>) e o não cisteínico (LTB<sub>4</sub>). O LTB<sub>4</sub> é um potente ativador pró-inflamatório, quimiotático de leucócitos tendo um importante papel na lesão de

IR pulmonar, sendo produzido por monócitos, linfócitos, mastócitos e macrófagos pulmonares (88).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e os seus receptores são fundamentais na regulação tanto da permeabilidade vascular quanto da sobrevivência de células endoteliais. Estudo de Mura et al, sugere que o VEGF pode ter duplo papel na LPA induzida pela IR intestinal. A liberação antecipada de VEGF pode aumentar a permeabilidade vascular pulmonar enquanto que a redução da expressão de VEGF e VEGFR-1 no tecido pulmonar pode contribuir para a morte das células epiteliais alveolares (26).

## **2.8 Fator de Transcrição Nuclear kappa B**

A família do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) compõe-se de cinco membros: REL-a (p65), NF- $\kappa$ B1 (p50; p105), NF- $\kappa$ B2 (p52; p100), c-REL e REL-b (89). Essas subunidades, exceto a REL-b, são homo ou heterodímeros que formam o NF- $\kappa$ B. O mais comum ativado em reações inflamatórias é o heterodímero de p50 e p65 (90).

A transcrição nuclear do NF- $\kappa$ B é regulada pela ação inibitória do inibidor de proteínas  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), que é alvo para degradação pela via de fosforilação pela ação de quinases I $\kappa$ B (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ ) (91). A sinalização inflamatória ativa uma cascata de evento, como a fosforilação do receptor TNF que leva à ativação do fator de crescimento transformante-b-quinase ativada 1 (TAK1) que fosforiza o complexo IKK e em seguida fosforiza a proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , resultando em ubiquinação, dissociação de I $\kappa$ B $\alpha$  com NF- $\kappa$ B e degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  pelo proteossoma. O NF- $\kappa$ B se desloca para o núcleo e liga-se com a banda específica de DNA, inicializando a transcrição de múltiplos genes, incluindo citocinas, quimocinas e outros mediadores inflamatórios (90).

O NF- $\kappa$ 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 (35). Este fator foi descrito primeiramente em 1986 por Sen e Baltimore (92) como sendo capaz de ligar-se a sítios específicos kappa como *enhancer* nas regiões promotoras dos genes das imunoglobulinas em células B (38).

O NF- $\kappa$ B pode ser ativado por uma variedade de sinais relevantes, conforme a etiologia e a fisiopatologia inflamatórias (35). 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 (TNF- $\alpha$ ), interleucinas, radicais livres e/ou oxidantes (35).

## 2.9 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) desempenha um papel importante na homeostase vascular pela seu papel vasorregulador potente e imunomodulador. Sabe-se que o NO atenua o extravassamento capilar e a lesão de tecidos provocadas em modelos de IR, inibindo a adesão de neutrófilos e a produção do ânion superóxido por neutrófilos (93).

O NO 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 (94).

O NO é também um mediador biológico chave produzido por vários tipos de células, inclusive o endotélio vascular, é um inibidor da agregação plaquetária e da aderência neutrofílica e modulador da permeabilidade vascular. Além disso, possui ações como broncodilatador e neurotransmissor (92).

Depois da IR pulmonar, os níveis de NO endógeno é reduzido. Esse fato pode estar associado com um aumento da expressão da NOS endotelial, o que pode sugerir que o NO endógeno produzido pode ser destruído rapidamente

por RL depois da reperfusão, e/ou porque a IR pode induzir a geração de inibidores de NOS (95). 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<sup>•</sup>). Essa perda da ação protetora do NO resultará em disfunção endotelial (94).

## 2.10 Ativação leucocitária

A lesão de IR no transplante pulmonar possui um padrão bifásico. A fase precoce da reperfusão, dependente principalmente das características do doador e a fase tardia, dependente das características do receptor e com duração de 24 horas. Os macrófagos do doador, ativados durante a isquemia são os mediadores da fase precoce, enquanto os linfócitos e neutrófilos do receptor estão envolvidos principalmente na fase tardia. O recrutamento dessas células ocorre pela liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios antes e após a reperfusão (96).

O macrófago alveolar produz uma grande quantidade de citocinas e fatores pró-coagulantes em resposta ao estresse oxidativo. Em modelo de IR foi demonstrado a importância do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon gama (INF- $\gamma$ ) e a proteína-1 quimioatrativa de macrófago (equivalente a IL-8 humana) na fase precoce da reperfusão do enxerto em ratos (97).

Os linfócitos desempenham importante papel na lesão de IR. O pulmão do doador contém grande número macrófagos e linfócitos ativados representados por células T e *natural killer* que são responsáveis por reação imunológica do tipo enxerto-hospedeiro, como também por efeitos imunomoduladores benéficos (98). Em modelo de transplante pulmonar em ratos foi observado que os linfócitos T CD4 são mediadores da lesão de IR, infiltrando o enxerto uma hora após a reperfusão e aumentando a produção de

INF- $\gamma$ , além disso, foi sugerido que este efeito independe do recrutamento e ativação de neutrófilos (52).

A participação dos leucócitos na lesão de reperfusão se dá pela liberação de substâncias a partir da degranulação dos mesmos. Entre as substâncias, algumas são radicais livres. Os polimorfonucleares possuem nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH-oxidase) capaz de reduzir a molécula de oxigênio, gerando o ânion superóxido. babior (99) (70).

Essas células também secretam a mieloperoxidase, enzima que catalisa a formação do ácido hipocloroso (HOCl), a partir da oxidação do íon cloro na presença de peróxido de hidrogênio. O HOCl reage com as aminas, gerando as cloraminas, potentes oxidantes (100).

Além das substâncias oxidantes os leucócitos produzem enzimas proteolíticas, incluindo elastase, colagenase e gelatinase, que participam da lesão tecidual (101).

Os neutrófilos têm a característica de progressivamente infiltrar o pulmão transplantado durante as primeiras 24 horas após a reperfusão (3). Embora tenham importante papel na fase tardia da lesão de reperfusão, seu papel na fase precoce é menos expressivo. Deeb e cols. demonstraram que a lesão de reperfusão nas primeiras quatro horas independe da presença dos neutrófilos, sendo importante o papel dos macrófagos nessa fase, no entanto, após esse período os neutrófilos são os principais mediadores (102, 103).

## **2.11 Apoptose e lesão de isquemia-reperfusão pulmonar**

A apoptose é processo ativo cuja marca registrada é a autodigestão controlada dos constituintes celulares, devida à ativação de proteases endógenas e pode ser comparada metaforicamente a um "suicídio celular". A ativação dessas proteases compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular. Em resposta à contração

do volume citoplasmático, a membrana celular forma bolhas e se altera o posicionamento de seus lipídios constituintes (104).

Diferente do que ocorre com a necrose, a apoptose ou morte celular programada não está presente durante a isquemia, porém ocorre um pico de sua expressão durante a reperfusão (105). A indução de apoptose ocorre pela ativação e indução de duas vias. A via intrínseca é dependente da mitocôndria, sendo ativada pelas ERO, enquanto a via extrínseca é dependente de moléculas inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , entretanto, ao ativar a produção de ERO pela via NADPH oxidase o TNF $\alpha$  contribuiria também com a via intrínseca (106). Ambas as vias promovem a ativação de caspases e de 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 (107). A via intrínseca é ativada na fase precoce da reperfusão, já a via extrínseca pode ser ativada até algumas horas após a reperfusão pulmonar (108).

## **2.12 Caspases**

A apoptose é regulada por uma cascata de proteínas chamadas Caspases, sendo essas as proteínas executoras da apoptose e estão presentes em todas as células. Após a clivagem, Caspases tornam-se ativos e iniciam vias que levam à apoptose (109).

São características da apoptose: a condensação da cromatina, exposição da fosfatidilserina à superfície da célula, encolhimento citoplasmático, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA (110). A apoptose é um processo dependente de energia, diferentemente da necrose que também ocorre na ausência de ATP (111).

Estudo de Forgiarini et al, foi demonstrado que o tempo de isquemia tem um efeito direto sobre a viabilidade das células de pulmão em um modelo

experimental de IR pulmonar. O aumento da atividade da caspase 3 refletia um maior número de células em apoptose após 45 minutos de isquemia (112).

A via de sinalização que leva à morte celular programada é mantida por reguladores positivos e negativos, esse equilíbrio entre tais fatores decide se a célula sofre apoptose ou se sobrevive. As proteínas que podem alterar-se para a sobrevivência são as proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, enquanto que as proteínas proapoptóticas Bax, Bad, Bak e Bis induzem à morte celular programada (113).

Um importante regulador de apoptose após a lesão do DNA é a proteína p53, que pode induzir a Bax e Bak, que regula a liberação de citocromo C da mitocôndria, iniciando assim a cascata que conduz à apoptose (114). O citocromo C liga-se ao fator de ativação de protease apoptótica 1 (Apaf-1) ativando a Caspase 9, que por sua vez cliva as Caspases 3 e 6 (115, 116) levando à morte celular.

### **2.13 Prevenção e Tratamento da lesão IR pulmonar**

A reperfusão rápida é necessária após a isquemia, porém esta reperfusão contribui para à lesão e destruição tecidual. Grandes avanços na compreensão dos mecanismos de lesão de reperfusão e no desenvolvimento de estratégias para tornar os tecidos mais resistentes à isquemia ou para atenuar a lesão de reperfusão tem sido investigados, por exemplo, estudos experimentais de respostas adaptativas induzidas pela hipóxia têm fornecido forte evidência para novas abordagens de tratamento durante a IR (64).

Sabendo que a lesão dos tecidos não está limitada apenas à isquemia, podendo se estender ou se agravar, com a reperfusão, o seu reconhecimento é importante para que se possa proceder à reversão da isquemia, ponto fundamental para a manutenção da viabilidade do tecido, de modo menos lesivo (48).

Devido a todos os danos teciduais que a IR causa diversos estudos em modelos animais têm se concentrado na prevenção da injúria de IR e melhora dos métodos de preservação pulmonar (117-119), por meio do uso de hiperinsuflação pulmonar (54, 120), preservação hipotérmica (121), soluções de preservação (122, 123), perfusão pulmonar por via retrógrada (124, 125), ventilação líquida (5), além da utilização de vasodilatadores (126, 127) e antioxidantes (128, 129), terapia gênica (130), óxido nítrico inalado (93), ventilação líquida (5), além do pré-condicionamento isquêmico (PCI).

Todas as opções terapêuticas testadas tentam por diferentes métodos, minimizar ou evitar a morte celular que ocorre durante a IR e conseqüentemente acaba ativando vários programas de morte celular, que podem ser classificados como necrose, apoptose ou morte celular associada à autofagia. A necrose caracteriza-se por edema de células e organelas com ruptura subseqüente de membranas da superfície e o derramamento de seu conteúdo intracelular (131).

As células necróticas são altamente imunoestimuladoras e levam a infiltração de células inflamatórias e a produção de citocinas. Em contraste, a apoptose envolve uma cascata de sinalização da caspase que induz um programa de morte celular, caracterizada pela contração da célula e do seu núcleo, com a integridade da membrana do plasma que persiste até o final do processo. Estudos investigam se a inibição da apoptose pode ser tornar uma estratégia terapêutica promissora para a lesão de isquemia-reperfusão (132, 133).

O fator de transcrição NF- $\kappa$ B também tem sido alvo de investigação, devido ao fato de modular a apoptose durante IR. A redução na disponibilidade de oxigênio está associada à ativação do NF- $\kappa$ B por meio de um mecanismo envolvendo hipóxia dependente da inibição dos sensores oxigênio (134).

Alguns estudos investigam se ratos com interrupção do gene que codifica a IKK-b, a subunidade catalítica de IKK que é essencial para a ativação do NF- $\kappa$ B, podem proporcionar uma oportunidade para estudar os efeitos de

prevenção da ativação da via do NF- $\kappa$ B. Porém esta manipulação resulta em letalidade embrionária devido a apoptose em massa do fígado em desenvolvimento impulsionado pelo NF- $\kappa$ B (135). Segundo Ishiyama e colaboradores (21) os quais estudaram a inibição da ativação do NF- $\kappa$ B através da transferência de genes inibidores da forma supressora do inibidor I $\kappa$ 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, Chang e colaboradores (107), demonstraram que a inibição do NF- $\kappa$ B atenua a lesão de IR assim como era responsável pela redução na produção de citocinas. Em seu estudo, a ativação do NF- $\kappa$ B foi responsável pelo aumento na expressão da caspase 3 e iNOS.

Outro estudo de isquemia intestinal e reperfusão revelou que, embora a deficiência do IKK-b em enterócitos está associada com uma redução da inflamação, um dano apoptótico grave ocorre na mucosa. Portanto a tentativa de inibir a via de ativação do NF- $\kappa$ B está relacionada com a prevenção da inflamação sistêmica mas conseqüentemente aumenta a lesão local (136).

Alguns bloqueadores do canal de cálcio também são utilizados, como o verapamil, o qual apresenta efeito protetor durante o evento de isquemia-reperfusão (137, 138). Em 1989, Wang et al. demonstraram que a preservação pulmonar a 10°C era superior a 15°C e a 4°C por ser uma temperatura mais adequada para o funcionamento da bomba de sódio (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase) (16).

Outras evidências sugerem que os TLRs estão envolvidos na injúria de IR de órgãos. Em um estudo de lesão de isquemia-reperfusão miocárdica, duas linhagens de camundongos deficientes de TLR4 (C57/BL10 SCCR e C3H/HeJ), mostraram significativamente menores áreas de infarto do miocárdio do que em cepas de controle (C57 / BL10 ScSn e C3H / OuJ ). Os animais deficientes de TLR4 também demonstraram redução de infiltração de neutrófilos, menor peroxidação lipídica e menor deposição de complemento nos tecidos cardíacos (139) (140).

Alguns estudos utilizaram o NO como método de preservação e este demonstrou-se eficaz em diminuir o dano da lesão de reperfusão em vários modelos animais. (141-144). Entretanto, o uso de NO na reperfusão pulmonar não diminuiu o edema pulmonar em um em ensaio clínico randomizado (93). 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 de IR e tempo de internação hospitalar e UTI (145). Ardehali e colaboradores (146), demonstraram que o uso do NO inalatório no pós-operatório apresentou benefício em um subgrupo de pacientes que desenvolveram lesão de IR, apesar de não diminuir sua incidência (146).

## **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 (147).

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 (148).

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 (149). Gases tais como hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, dióxido de carbono e gases inertes são altamente solúveis em PFC (150, 151). A difusibilidade do oxigênio e dióxido de carbono nos PFCs é baixa quando comparada com a do nitrogênio 39 atmosférico; há maior solubilidade e difusibilidade do CO<sub>2</sub> em até cinco vezes quando comparado com o O<sub>2</sub> (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.) (152-154).

Os PFCs 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.

Estudo recente utilizou o PFC vaporizado na SARA e demonstrou que a utilização de PFC vaporizado resulta em uma melhoria sustentada da troca gasosa e da mecânica pulmonar, sendo a técnica de aplicação de vaporização uma alternativa razoável para administrar PFCs em lesões pulmonares graves (155).

Hübler M e colaboradores avaliaram os efeitos do PFC vaporizado sobre o fluxo sanguíneo pulmonar e a distribuição ventilação/ perfusão em um modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo e concluíram que o tratamento com PFC vaporizado melhora a troca gasosa aumentando a heterogeneidade ventilação/perfusão em todo o pulmão (19).

Estudo de Forgiarini e colaboradores verificaram que o PFC endobrônquico reduz a atividade inflamatória antes e após o transplante pulmonar em um modelo animal experimental, concluem também que o uso de PFC endobrônquico como adjuvante da estratégia de preservação atual melhorou a viabilidade do enxerto (156).

Desta forma, a utilização de PFC 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**

A lesão pulmonar de IR apresenta-se como fator complicante ao transplante pulmonar, necessitando de constantes aprimoramentos nas técnicas de preservação pulmonar. Os avanços nas técnicas e estudos utilizando diferentes estratégias de proteção pulmonar objetivam o aumento no tempo de preservação pulmonar e melhor viabilidade do enxerto, resultando em um desempenho mais adequado do órgão pós-transplante. Esta proteção evitaria a disfunção primária do enxerto, o que teria influencia direta no resultado funcional a longo prazo do enxerto.

O método de uso clínico corrente para a preservação pulmonar é a administração de soluções frias 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 durante este processo. Uma destas alternativas de tratamento poderia ser a utilização de PFC vaporizado, uma vez que os PFCs líquidos tem demonstrado efeitos benéficos em lesão pulmonar aguda. Dessa forma, a associação entre o PFC vaporizado e o líquido de preservação pulmonar (baixo potássio e dextran- LPD) teria o potencial de aumentar a proteção de enxertos pulmonares e melhorar a preservação destes pulmões quanto submetidos a diferentes tipos de isquemia fria.

Além disso, o PFC vaporizado poderia atuar também como uma substância protetora na lesão de isquemia e reperfusão permitindo um melhor desempenho dos enxertos e redução da atividade inflamatória envolvida neste processo. A comprovação de tal efeito poderia resultar em benefícios diretos ao processo de transplante pulmonar, através uma melhora da qualidade de preservação dos enxertos e menor complicações relacionadas ao processo de isquemia e reperfusão.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Testar a aplicabilidade do perfluorocarbono vaporizado na proteção pulmonar em diferentes modelos animais de lesão pulmonar.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar se a utilização do perfluorocarbono vaporizado em períodos prolongados de isquemia reduz a atividade inflamatória durante o período de armazenamento do órgão.

- Avaliar o efeito protetor do perfluorocarbono vaporizado sobre o pulmão durante a lesão de isquemia e reperfusão.

## 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. *The Annals of thoracic surgery*. 1991;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. *The Annals of thoracic surgery*. 1993;55(5):1185-91.
3. Adoumie R, Serrick C, Giaid A, Shennib H. Early cellular events in the lung allograft. *The Annals of thoracic surgery*. 1992;54(6):1071-6; discussion 6-7.
4. 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;70(10):1417-24.
5. 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.
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. *Critical care medicine*. 2000;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;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. *Annals of surgery*. 1995;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. *The Journal of pediatrics*. 1995;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 <sup>19</sup>F magnetic resonance reporters of regional pulmonary pO<sub>2</sub>. *Investigative radiology*. 1997;32(1):29-38.

11. 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;100(5):E5.
12. Waschke KF, Frietsch T. Modified haemoglobins and perfluorocarbons. Current opinion in anaesthesiology. 1999;12(2):195-202.
13. Wolfson MR, Greenspan JS, Shaffer TH. Pulmonary administration of vasoactive substances by perfluorochemical ventilation. *Pediatrics*. 1996;97(4):449-55.
14. Fuhrman BP, Paczan PR, DeFrancis M. Perfluorocarbon-associated gas exchange. *Critical care medicine*. 1991;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. *The Annals of thoracic surgery*. 1999;67(2):332-9.
16. Wang LS, Yoshikawa K, Miyoshi S, Nakamoto K, Hsieh CM, Yamazaki F, et al. The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a simple ex vivo rabbit model used for functional assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1989;98(3):333-42.
17. Kandler MA, von der Hardt K, Schoof E, Dotsch J, Rascher W. Persistent improvement of gas exchange and lung mechanics by aerosolized perfluorocarbon. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(1):31-5.
18. de Abreu MG, Quelhas AD, Spieth P, Brauer G, Knels L, Kasper M, et al. Comparative effects of vaporized perfluorohexane and partial liquid ventilation in oleic acid-induced lung injury. *Anesthesiology*. 2006;104(2):278-89.
19. Hubler M, Souders JE, Shade ED, Polissar NL, Schimmel C, Hlastala MP. Effects of vaporized perfluorocarbon on pulmonary blood flow and ventilation/perfusion distribution in a model of acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology*. 2001;95(6):1414-21.
20. Yamane M, Liu M, Kaneda H, Uhlig S, Waddell TK, Keshavjee S. Reperfusion-induced gene expression profiles in rat lung transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(9):2160-9.
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;130(1):194-201.

22. Quadri SM, Segall L, de Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, et al. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(2):292-9.
23. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*. 1986;250(6 Pt 1):G749-53.
24. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine*. 2007;357(11):1121-35.
25. Pegg DE. Organ preservation. *Surg Clin North Am*. 1986;66(3):617-32.
26. Mura M, Andrade CF, Han B, Seth R, Zhang Y, Bai XH, et al. Intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs. *Shock*. 2007;28(2):227-38.
27. Ambros JT, Herrero-Fresneda I, Borau OG, Boira JM. Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2007;20(3):219-29.
28. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci*. 1994;307(4):284-92.
29. Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian-Macaulay A, Brett J, Stern D. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties. *J Clin Invest*. 1990;85(4):1090-8.
30. Pinheiro BV, Holanda MA, Araujo FG, Romaldini H. Lesão pulmonar de reperfusão. *J Pneumol*. 1999;25(2):124-36.
31. Menger MD. Microcirculatory disturbances secondary to ischemia-reperfusion. *Transplant Proc*. 1995;27(5):2863-5.
32. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
33. Jerome SN, Dore M, Paulson JC, Smith CW, Korhuis RJ. P-selectin and ICAM-1-dependent adherence reactions: role in the genesis of postischemic no-reflow. *Am J Physiol*. 1994;266(4 Pt 2):H1316-21.
34. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985;312(3):159-63.
35. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:67-101.

36. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*. 1981;81(1):22-9.
37. DeCampos KN, Keshavjee S, Liu M, Slutsky AS. Prevention of rapid reperfusion-induced lung injury with prostaglandin E1 during the initial period of reperfusion. *J Heart Lung Transplant*. 1998;17(11):1121-8.
38. McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol*. 1982;60(11):1346-52.
39. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc*. 1988;63(4):381-9.
40. 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;78(2):442-9.
41. Mullane KM, Salmon JA, Kraemer R. Leukocyte-derived metabolites of arachidonic acid in ischemia-induced myocardial injury. *Federation proceedings*. 1987;46(7):2422-33.
42. Oredsson S, Plate G, Qvarfordt P. Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury in skeletal muscle. *The European journal of surgery = Acta chirurgica*. 1994;160(2):97-103.
43. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clinic proceedings*. 1988;63(4):390-408.
44. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *The American journal of physiology*. 1988;255(6 Pt 2):H1269-75.
45. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *American heart journal*. 1999;138(2 Pt 2):S69-75.
46. Cooper JD, Patterson GA, Trulock EP. Results of single and bilateral lung transplantation in 131 consecutive recipients. *Washington University Lung Transplant Group*. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994;107(2):460-70; discussion 70-1.
47. King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, et al. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *The Annals of thoracic surgery*. 2000;69(6):1681-5.
48. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *American journal of surgery*. 1991;161(4):488-503.



49. Conte JV, Baumgartner WA. Overview and future practice patterns in cardiac and pulmonary preservation. *J Card Surg.* 2000;15(2):91-107.
50. Sun CK, Yen CH, Lin YC, Tsai TH, Chang LT, Kao YH, et al. Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells markedly reduced acute ischemia-reperfusion lung injury in a rodent model. *J Transl Med.* 2011;9:118.
51. Ucar G, Topaloglu E, Kandilci HB, Gumusel B. Effect of ischemic preconditioning on reactive oxygen species-mediated ischemia--reperfusion injury in the isolated perfused rat lung. *Clin Biochem.* 2005;38(7):681-4.
52. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2003;167(4):490-511.
53. Novick RJ, Gehman KE, Ali IS, Lee J. Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *The Annals of thoracic surgery.* 1996;62(1):302-14.
54. 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.
55. 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;105(3):480-91.
56. 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.
57. 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;79(1):147-54.
58. Rahman I, Marwick J, Kirkham P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(6):1255-67.
59. Al-Mehdi AB, Shuman H, Fisher AB. Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am J Physiol.* 1997;272(2 Pt 1):L294-300.
60. Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation.* 2005;79(5):505-14.

61. Xia Z, Chen Y, Fan Q, Xue M. Oxidative stress-mediated reperfusion injury: mechanism and therapies. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014:373081.
62. Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O. Effect of lung ischemia--reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2006;29(3):294-8.
63. McMillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common pathway of endothelial-leukocyte interaction in shock, ischemia, and reperfusion. *American journal of surgery*. 1993;166(5):557-62.
64. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nature medicine*. 2011;17(11):1391-401.
65. Grenz A, Clambey E, Eltzschig HK. Hypoxia signaling during intestinal ischemia and inflammation. *Current opinion in critical care*. 2012;18(2):178-85.
66. Park SW, Kim M, Brown KM, D'Agati VD, Lee HT. Paneth cell-derived interleukin-17A causes multiorgan dysfunction after hepatic ischemia and reperfusion injury. *Hepatology*. 2011;53(5):1662-75.
67. Zhao G, Ayene IS, Fisher AB. Role of iron in ischemia-reperfusion oxidative injury of rat lungs. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1997;16(3):293-9.
68. Ciesla DJ, Moore EE, Johnson JL, Burch JM, Cothren CC, Sauaia A. The role of the lung in postinjury multiple organ failure. *Surgery*. 2005;138(4):749-57; discussion 57-8.
69. Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*. 1989;70(6):737-57.
70. Sperling J, Chebath J, Arad-Dann H, Offen D, Spann P, Lehrer R, et al. Possible involvement of (2'5')oligoadenylate synthetase activity in pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(23):10377-81.
71. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 5):1147-50.
72. Leite PF, Danilovic A, Moriel P, Dantas K, Marklund S, Dantas AP, et al. Sustained decrease in superoxide dismutase activity underlies constrictive remodeling after balloon injury in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(12):2197-202.

73. Farber JL, Chien KR, Mitnacht S, Jr. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *The American journal of pathology*. 1981;102(2):271-81.
74. Paterson RL, Galley HF, Webster NR. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Critical care medicine*. 2003;31(11):2574-8.
75. Inci I, Erne B, Arni S, Jungraithmayr W, Inci D, Hillinger S, et al. Prevention of primary graft dysfunction in lung transplantation by N-acetylcysteine after prolonged cold ischemia. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29(11):1293-301.
76. Chatterjee S, Fisher AB. ROS to the rescue. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(4):L704-5.
77. Pahncke D, Kvasnicka J, Beetke E, Dobias J, Vyhnanek K. [A novel method of conservative therapy of infected dental root canal by means of chlorhexidine and corticoids]. *Stomatologie der DDR*. 1989;39(6):377-83.
78. Rosen GM, Freeman BA. Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(23):7269-73.
79. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum*. 1986;548:47-63.
80. Andrade CF, Kaneda H, Der S, Tsang M, Lodyga M, Chimisso Dos Santos C, et al. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2006;25(11):1317-23.
81. Uhlig S, Goggel R, Engel S. Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung. *Pharmacol Rep*. 2005;57 Suppl:206-21.
82. Farrukh IS, Michael JR, Peters SP, Sciuto AM, Adkinson NF, Jr., Freeland HS, et al. The role of cyclooxygenase and lipoxygenase mediators in oxidant-induced lung injury. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137(6):1343-9.
83. 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;72(9):1505-12.

84. Matsuzaki Y, Waddell TK, Puskas JD, Hirai T, Nakajima S, Slutsky AS, et al. Amelioration of post-ischemic lung reperfusion injury by prostaglandin E1. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(4 Pt 1):882-9.
85. Drost EM, MacNee W. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur J Immunol.* 2002;32(2):393-403.
86. Grissom CK, Orme JF, Jr., Richer LD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Elstad MR. Platelet-activating factor acetylhydrolase is increased in lung lavage fluid from patients with acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine.* 2003;31(3):770-5.
87. Baek SH, Kim JY, Choi JH, Park EM, Han MY, Kim CH, et al. Reduced glutathione oxidation ratio and 8 ohdG accumulation by mild ischemic pretreatment. *Brain Res.* 2000;856(1-2):28-36.
88. Yoshimura K, Nakagawa S, Koyama S, Kobayashi T, Homma T. Roles of neutrophil elastase and superoxide anion in leukotriene B4-induced lung injury in rabbit. *J Appl Physiol.* 1994;76(1):91-6.
89. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-60.
90. Souza JA, Rossa C, Jr., Garlet GP, Nogueira AV, Cirelli JA. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(2):128-38.
91. Nath B, Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases. *Hepatology.* 2012;55(2):622-33.
92. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986;47(6):921-8.
93. 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.* 2006;129(4):1024-30.
94. Hart CM. Nitric oxide in adult lung disease. *Chest.* 1999;115(5):1407-17.
95. Marczin N, Riedel B, Gal J, Polak J, Yacoub M. Exhaled nitric oxide during lung transplantation. *Lancet.* 1997;350(9092):1681-2.
96. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, Laubach VE, et al. Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and

circulating leukocytes in a biphasic response. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121(6):1069-75.

97. Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol.* 1997;150(5):1773-84.

98. Richter N, Raddatz G, Steinhoff G, Schafers HJ, Schlitt HJ. Transmission of donor lymphocytes in clinical lung transplantation. *Transpl Int.* 1994;7(6):414-9.

99. Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME, Babior BM, Curnutte JT. Neutrophils and host defense. *Annals of internal medicine.* 1988;109(2):127-42.

100. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *The New England journal of medicine.* 1989;320(6):365-76.

101. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil elastase and oxygen radicals: synergism in lung injury after hindlimb ischemia. *The American journal of physiology.* 1991;260(6 Pt 2):H1852-6.

102. Steimle CN, Guynn TP, Morganroth ML, Bolling SF, Carr K, Deeb GM. Neutrophils are not necessary for ischemia-reperfusion lung injury. *The Annals of thoracic surgery.* 1992;53(1):64-72; discussion -3.

103. Deeb GM, Grum CM, Lynch MJ, Guynn TP, Gallagher KP, Ljungman AG, et al. Neutrophils are not necessary for induction of ischemia-reperfusion lung injury. *J Appl Physiol.* 1990;68(1):374-81.

104. Parolin MB, Reason IJ. [Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases]. *Arquivos de gastroenterologia.* 2001;38(2):138-44.

105. Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S, Vogt P, Odermatt B, Weder W, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation. *The Annals of thoracic surgery.* 2000;69(5):1532-6.

106. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica.* 2003;88(2):212-8.

107. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):821-46.

108. 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;22(2):147-9.

109. Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of clinical pathology.* 2004;57(10):1009-14.

110. van de Schepop HA, de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Counting of apoptotic cells: a methodological study in invasive breast cancer. *Clinical molecular pathology*. 1996;49(4):M214-7.
111. McClintock DS, Santore MT, Lee VY, Brunelle J, Budinger GR, Zong WX, et al. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(1):94-104.
112. Forgiarini JR L, Grün G, Kretzmann N, de Munoz G, Almeida A, Forgiarini L, et al. When is injury potentially reversible in a lung ischemiareperfusion model? *Journal of Surgical Research*. 2013;179(1):7.
113. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(2):1156-63.
114. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001;292(5517):727-30.
115. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91(4):479-89.
116. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences*. 1997;22(8):299-306.
117. de Kerchove L, Boodhwani M, Etienne PY, Poncelet A, Glineur D, Noirhomme P, et al. Preservation of the pulmonary autograft after failure of the Ross procedure. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010;38(3):326-32.
118. de Perrot M, Keshavjee S. Lung preservation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;16(4):300-8.
119. Zhang YX, Fan H, Shi Y, Xu ST, Yuan YF, Zheng RH, et al. Prevention of lung ischemia-reperfusion injury by short hairpin RNA-mediated caspase-3 gene silencing. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139(3):758-64.
120. D'Armini AM, Roberts CS, Griffith PK, Lemasters JJ, Egan TM. When does the lung die? I. Histochemical evidence of pulmonary viability after "death". *J Heart Lung Transplant*. 1994;13(5):741-7.
121. 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.

122. Albes JM, Brandes H, Heinemann MK, Scheule A, Wahlers T. Potassium-reduced lung preservation solutions: a screening study. *Eur Surg Res.* 1997;29(5):327-38.
123. Sakamaki F, Hoffmann H, Muller C, Dienemann H, Messmer K, Schildberg FW. Reduced lipid peroxidation and ischemia-reperfusion injury after lung transplantation using low-potassium dextran solution for lung preservation. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 1997;156(4 Pt 1):1073-81.
124. Alvarez A, Salvatierra A, Lama R, Algar J, Cerezo F, Santos F, et al. Preservation with a retrograde second flushing of Eurocollins in clinical lung transplantation. *Transplant Proc.* 1999;31(1-2):1088-90.
125. Chen CZ, Gallagher RC, Ardery P, Dyckman W, Low HB. Retrograde versus antegrade flush in canine left lung preservation for six hours. *J Heart Lung Transplant.* 1996;15(4):395-403.
126. Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, Hooper TL. Relative importance of prostaglandin/cyclic adenosine monophosphate and nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathways in lung preservation. *The Annals of thoracic surgery.* 1996;62(5):1494-9.
127. Bonser RS, Fragomeni LS, Jamieson SW, Fischel RJ, Harris KM, Edwards BJ, et al. Effects of prostaglandin E1 in twelve-hour lung preservation. *J Heart Lung Transplant.* 1991;10(2):310-5; discussion 6.
128. Egan TM, Ulicny KS, Jr., Lambert CJ, Jr., Wilcox BR. Effect of a free radical scavenger on cadaver lung transplantation. *The Annals of thoracic surgery.* 1993;55(6):1453-9.
129. Sagone AL, Jr., Husney RM, Wewers MD, Herzyk DJ, Davis WB. Effect of dimethylthiourea on the neutrophil myeloperoxidase pathway. *J Appl Physiol.* 1989;67(3):1056-62.
130. 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. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 2000;120(5):947-56.
131. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009;361(16):1570-83.
132. Thakar CV, Zahedi K, Revelo MP, Wang Z, Burnham CE, Barone S, et al. Identification of thrombospondin 1 (TSP-1) as a novel mediator of cell injury in kidney ischemia. *The Journal of clinical investigation.* 2005;115(12):3451-9.
133. Tang Z, Arjunan P, Lee C, Li Y, Kumar A, Hou X, et al. Survival effect of PDGF-CC rescues neurons from apoptosis in both brain and retina by

regulating GSK3beta phosphorylation. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(4):867-80.

134. Liang MH, Chuang DM. Regulation and function of glycogen synthase kinase-3 isoforms in neuronal survival. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(6):3904-17.

135. Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the I $\kappa$ B kinase 2 gene. *Science*. 1999;284(5412):321-5.

136. Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, Karin M. The two faces of IKK and NF- $\kappa$ B inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nature medicine*. 2003;9(5):575-81.

137. Swoboda L, Clancy DE, Donnebrink MA, Rieder-Nelissen CM. The influence of verapamil on lung preservation. A study on rabbit lungs with a reperfusion model allowing physiological loading. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1993;41(2):85-92.

138. 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;49(6):1039-43.

139. Oyama J, Blais C, Jr., Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation*. 2004;109(6):784-9.

140. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(5):969-75.

141. Yamagishi H, Yamashita C, Okada M. Preventive influence of inhaled nitric oxide on lung ischemia-reperfusion injury. *Surg Today*. 1999;29(9):897-901.

142. 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;99(6):2423-32.

143. 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;54(7):477-83.



144. 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. *The Annals of thoracic surgery*. 2004;78(1):292-7.
145. 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. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;167(11):1483-9.
146. 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;72(1):112-5.
147. 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. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2010;139(5):1306-15.
148. Clark LC, Jr., Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science*. 1966;152(3730):1755-6.
149. Sargent JW, Seffl RJ. Properties of perfluorinated liquids. *Federation proceedings*. 1970;29(5):1699-703.
150. Peterson RE. Measurement of the solubility of gases in oils. *Federation proceedings*. 1970;29(5):1714-6.
151. Osburn JO. A method for estimating the solubility of gases in liquids. *Federation proceedings*. 1970;29(5):1704-7.
152. Patel MM, Szanto P, Yates B, Long DM. Survival and histopathologic changes in lungs of hamsters following synthetic liquid breathing. *Federation proceedings*. 1970;29(5):1740-5.
153. Tuazon JG, Modell JH, Hood CI, Swenson EW. Pulmonary function after ventilation with fluorocarbon liquid (Caroxin-D). *Anesthesiology*. 1973;38(2):134-40.
154. Saga S, Modell JH, Calderwood HW, Lucas AJ, Tham MK, Swenson EW. Pulmonary function after ventilation with fluorocarbon liquid P-12F (caroxin-F). *Journal of applied physiology*. 1973;34(2):160-4.
155. Wang X, Zhang J, Li X, Liu Y, Yang H, Zhao X, et al. Sustained improvement of gas exchange and lung mechanics by vaporized perfluorocarbon inhalation in piglet acute lung injury model. *The clinical respiratory journal*. 2014;8(2):160-6.

156. Forgiarini Junior LA, Holand AR, Forgiarini LF, da Rosa DP, Marroni NA, Cardoso PF, et al. Endobronchial perfluorocarbon reduces inflammatory activity before and after lung transplantation in an animal experimental model. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:193484.

## 6. ARTIGO I -

ARTIGO PUBLICADO

Hindawi Publishing Corporation  
Oxidative Medicine and Cellular Longevity  
Volume 2015, Article ID 590987, 14 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/590987>  
Impact Factor 4.492  
Citation: 13

Review Article

### **OXIDATIVE STRESS AND LUNG ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY**

Renata Salatti Ferrari<sup>1,2</sup>, Cristiano Feijó Andrade<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Pulmonology, Federal University of Rio Grande of Sul - UFRGS

<sup>2</sup>Hospital of Clinicas of Porto Alegre - HCPA/UFRGS

**Abstract:** Ischemia-reperfusion (IR) injury is directly related to the formation of reactive oxygen species (ROS), endothelial cell injury, increased vascular permeability, and the activation of neutrophils and platelets, cytokines and the complement system. Several studies have confirmed the destructive ness of the toxic oxygen metabolites produced and their role in the pathophysiology of different processes, such as oxygen poisoning, inflammation and ischemic injury. Due to the different degrees of tissue damage resulting from the process of ischemia and subsequent reperfusion, several studies in animal models have focused on the prevention of IR injury and methods of lung protection. Lung IR injury has clinical relevance in the setting of lung transplantation and cardiopulmonary bypass, for which the consequences of IR injury maybe devastating in critically ill patients.

## Introduction

The process of ischemia and subsequent reperfusion is present in many medical situations such as major surgical procedures and organ transplantation. This event may lead to devastating consequences in some patients; therefore, the understanding of this process is extremely important in the seek for new therapies and procedures that could reduce tissue injury (1).

Tissue damage to a particular organ when subjected to ischemia is exacerbated at the moment of its reoxygenation during reperfusion, a process that is considered to be more harmful than ischemia itself (2). This mechanism of tissue injury is called reperfusion injury or ischemia-reperfusion (IR) injury and consists of a complex pathophysiological phenomenon requiring the presence of oxygen for its genesis, as well as the maintenance and activation of vascular, humoral and cellular factors.

In its classical manifestation, occlusion of the arterial supply is caused by an embolus or a plug, resulting in ischemia and consequently a serious imbalance between the supply and metabolic demand, causing tissue hypoxia. During reperfusion, the restoration of blood flow is often associated with an exacerbation of tissue injury and an intense inflammatory response (3).

Ischemia directly affects cells and triggers a series of events due to a lack of oxygen, resulting in different intensities of cellular damage and the consequent activation of cytotoxic enzymes, ultimately culminating in cell death.

Oxidative phosphorylation does not occur in mitochondria during oxygen deprivation; anaerobic glycolysis then begins to provide energy but is not suitable for the replenishment of adenosine triphosphate (ATP). This ATP deficit affects the active transport of ions across the membrane, leading to an accumulation of sodium and, by diffusion, water inside the cell, with subsequent edema. This imbalance also occurs within organelles, leading to the swelling and disintegration of mitochondria and the expansion and formation of vesicles

in the endoplasmic reticulum. The rupture of lysosomes and release of enzymes contained therein represent the final events prior to cell death (4).

Reperfusion injury is directly related to the formation of reactive oxygen species (ROS), endothelial cell injury, increased vascular permeability, and the activation of neutrophils and platelets, cytokines and the complement system (5).

When exposed to hypoxia, endothelial cells alter their cytoskeletal morphology, forming small intercellular pores, and the presence of these pores provides increased permeability of the endothelium, with the formation of tissue edema (6). The worsening of perfusion is enhanced by an imbalance in the production of vasoconstrictor and vasodilator factors. Hypoxic endothelium shows increased production of potent vasoconstrictors (endothelin types 1, 2 and 3) and decreased production of vasodilators (nitric oxide) (2). These changes initiated during ischemia, particularly in endothelial cells and leukocytes, not only cause tissue injury but also create conditions that favor future injury with the occurrence of reperfusion. Another effect that has been demonstrated after a period of ischemia reperfusion is the impairment of certain segments of the microcirculation, generating heterogeneity in the distribution of blood flow, with focal tissue hypoxia. This phenomenon, called non-reperfusion (no-reflow), is another mechanism of tissue injury after reperfusion (7).

Due to the complications of IR-induced injury, as well as its high morbidity and mortality, several studies have investigated the pathophysiology of IR injury in an attempt to prevent or reverse its deleterious effects.

### **Oxidative stress and ischemia-reperfusion**

Oxidative stress has a role in the pathogenesis of several clinical conditions, such as malignancy, diabetes mellitus, atherosclerosis, chronic inflammation, infection with the human immunodeficiency virus and IR injury (8). There are different pathways for the production of reactive oxygen species (9),

especially via xanthineoxidase as the primary source of production in most organs with systemic vasculature (10). ROS formation occurs in the mitochondrial matrix through the electron transport chain due to the reduction of molecular oxygen to superoxide radical ( $O_2^-$ ) (11).

When a tissue is subjected to ischemia, a sequence of chemical reactions is initiated. Despite the lack of identification of a critical event responsible for tissue damage, most studies have shown that the depletion of energy and the accumulation of toxic oxygen metabolites (oxidative stress) can contribute to cell death. Paradoxically, reperfusion quickly restores the energy supply by removing toxic metabolites and preventing organ failure; however, it also contributes and amplifies the mechanisms involved in ischemic tissue damage (5).

During tissue ischemia, a reduction in the availability of ATP as a result of the degradation on adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (12), adenosine, inosine and hypoxanthine occurs. Furthermore, xanthine dehydrogenase is converted to xanthineoxidase.

This reaction can occur through two mechanisms: 1) xanthine dehydrogenase can be reversibly converted to xanthineoxidase via the oxidation of sulfhydryl groups; or 2) xanthine dehydrogenase can be irreversibly converted to xanthine oxidase via proteolysis through proteases activated by calcium, which is increased in the cytosol and derived from the extracellular environment (5).

Xanthine oxidase relies on oxygen to metabolize hypoxanthine, and when this is provided by reperfusion (reoxygenation), ROS molecules are formed, with a large capacity to cause injury to tissue (5).

NADPH oxidase, an enzyme expressed in virtually all inflammatory cells, contributes to the formation of cytotoxic peroxynitrite. Furthermore, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) derived from the dismutation of  $O_2$  results in highly toxic hydroxyl

radical ( $\text{OH}^\cdot$ ) by the Haber-Weiss reaction, which is facilitated by the increased availability of free iron during ischemia (13) (Figure 1).

Xanthine dehydrogenase uses nicotinamide dinucleotide phosphate (NADP) and may be irreversibly converted to xanthine oxidase. Additionally, proteases are activated by calcium, which is increased in the cytosol. In the presence of oxygen resulting from reperfusion, xanthine oxidase (XO) metabolizes hypoxanthine, forming ROS. Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) generates hydroxyl radical ( $\text{OH}^\cdot$ ), which is highly toxic, by the Haber-Weiss reaction, which is facilitated by the increased availability of free iron during ischemia. The increase in ROS results in major pulmonary tissue damage.

The importance of oxygen radicals in the pathophysiology of IR injury was demonstrated after the injection of free radical scavengers or enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX), preventing the damage that occurs during reperfusion (14) (15).

Several studies have confirmed the destructiveness of the derived toxic oxygen metabolites and their role in the pathophysiology of different processes, such as oxygen poisoning, inflammation and ischemic injury (16) .

### **Oxidative stress and lung ischemia-reperfusion injury**

The mechanisms of IR injury in the pulmonary parenchyma are similar to reperfusion injury in other organs and include a significant involvement of ROS, intracellular calcium influx, endothelial cell injury, leukocyte sequestration and activation in the pulmonary circulation, activation of the complement system, and the release of inflammatory mediators such as arachidonic acid metabolites (2).

Pulmonary IR injury can occur due to trauma, atherosclerosis, pulmonary embolism and surgical procedures, such as cardiopulmonary bypass (CPB) and

lung transplantation (17). The latter is the most studied situation because it is directly related to the incidence of early graft dysfunction and is responsible for up to 20% of mortality in the early postoperative period (18, 19).

The IR-induced lung injury that occurs in the setting of lung transplantation is characterized by edema, hypoxemia and pulmonary infiltrates on chest x-ray (20).

This occurs mainly in post-capillary venules, increasing hydrostatic pressure and favoring the formation of edema, which is facilitated by the increased capillary permeability caused by endothelial injury. ROS have a key role in the development of pulmonary injury (IR) (21, 22), which is characterized by increases in ROS and other free radicals, with a crucial role in the sequence of events leading to lung failure (23).

The IR phenomenon occurs in the heart, liver, kidney, gut, central nervous system, skeletal muscles, and other organs (8). In these organs, ischemia is accompanied by tissue anoxia until the reintroduction of oxygen during reperfusion and is thus the equivalent IR anoxia-reoxygenation. Unlike other organs, the lung is considered the only organ that can suffer ischemia without hypoxia because alveolar oxygen helps to maintain aerobic metabolism, thereby preventing hypoxia. Thus, the oxidative stress in the lung resulting from ischemia should be distinguished from that resulting from hypoxia itself (24).

In the setting of lung transplantation, factors present in the pre-reperfusion phase of the graft, such as brain death, pneumonia, mechanical ventilation, aspiration, contusion, hypotension and cold ischemia, have been recognized as aggravating IR injury through the activation of inflammatory factors (24, 25).

Hypoxia and consequently anoxia result in a decrease in intracellular ATP and an increase in ATP degradation products, such as hypoxanthine, which generates ROS production when oxygen is reintroduced during reperfusion and / or ventilation. During ischemia, this phenomenon may occur in



the lung if the alveolar oxygen tension drops below 7 mmHg (26, 27). The absence of pulmonary blood flow leads to lipid peroxidation, even in the presence of oxygen. The mechanism of oxidative stress is different from what occurs during anoxia-reoxygenation because it is not associated with decreased ATP, and it may occur even during the period of cold ischemia in an organ stored for transplantation (28).

In the lungs, ROS are related to the activation of inflammatory processes through transcription factors such as nuclear factor-kappa B (NF-kB), leading to chromatin remodeling and the expression of proinflammatory mediator genes (29, 30). Intracellular ROS production has been observed in various cell types of lung tissue, including endothelial cells, alveolar type II epithelial cells, clara cells, ciliated epithelial cells and alveolar macrophages (31). It is believed that IR pulmonary injury is due to an increase in ROS, which triggers a response from the graft, resulting in the activation of the adaptive immune response (acute rejection) through the activation of antigen-presenting (32). Additionally, the use of LPD (low-potassium dextran), a lung preservation solution, appears to decrease ROS production (33) and reduce the incidence of primary graft failure through a reduction in ROS production from the pulmonary vasculature (34).

### **Systemic effects of ischemia-reperfusion injury**

IR injury and multiple organ failure contribute significantly to mortality and postoperative morbidity, and reperfusion induces the oxidative stress that plays a key role in this pathology. Pulmonary IR injury induces systemic effects in the liver and heart and is characterized by neutrophil sequestration and the release of significant amounts of ROS into the circulation **(35) (36)**.

However, the pulmonary system may also suffer consequences from IR tissue located remotely **(37)**: a single organ exposed to IR can subsequently cause inflammatory activation in other organs, leading to the failure on multiple systems. Importantly, ischemic syndromes are a heterogeneous group of

conditions. Although there are some similarities in biological responses between these syndromes that occur in different organs, there are important differences between a reduction in systemic perfusion, e.g., during shock, compared with regional ischemia and the reperfusion of a single organ (38).

During IR injury in the liver or kidney, the activation of intestinal inflammatory responses triggers a sequence of events that leads to multi-organ failure. The IR of peripheral organs (such as the liver) results in the activation of intestinal Paneth cells and the subsequent release of cytokines such as IL-17, causing failure in other systems, including the pulmonary system (39) (40).

The systemic inflammatory responses of mesenteric IR represent an important model of severe disease because deficits in the intestinal mucosa appear to be critical in the initiation and propagation of multiple organ failure (41).

Using a mouse model of intestinal IR injury, Mura et al reported that nearly 50% of the IR group animals died during the experimental period of 4 h. The combined effects of intestinal IR, surgical procedure, the application of a high oxygen concentration and mechanical ventilation may be responsible for this high mortality rate. In this model, the lung was the most severely injured remote organ (4). Additionally, a recent clinical study confirmed that respiratory dysfunction following traumatic injury is an obligatory event that precedes heart, kidney and liver failure (4, 47).

Recent studies also report that activated neutrophils aggregate in the sub endothelial space, where they release reactive oxygen species (ROS), enzymes, and cytokines, causing direct renal injury and the recruitment of monocytes and macrophages leading to further aggravation of the oxidative injury (42) (43).

### **The antioxidant defense system**

An antioxidant is any substance that, even at low concentrations, significantly delays or inhibits the oxidation of a substrate in an enzymatic or non-enzymatic manner (44).

The organism's defense against ROS ranges from the prevention of ROS formation to interception of the formed radicals to cell repair. Enzymes that control the levels of ROS are glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), leading to the sequestration and deactivation of ROS, which are neutralized to prevent the further oxidation of other molecules. The final neutralization of a compound with one or more unpaired electrons is the formation of another non-radical product.

Water-soluble radical compounds transfer the radical function away from the potential target site and are called free radical scavengers. The combination of a substance with a free radical leads to the formation of a non-radical or a radical that is less harmful, for example, tocopherols and carotenoids (44).

Antioxidant therapy can be performed by the replacement of endogenous antioxidants, such as recombinant superoxide dismutase [52], or by exogenous supplementation of antioxidant agents, such as N-acetylcysteine (45).

However, the use of antioxidants in animal models of lung injury has been little exploited in experimental and clinical studies, e.g., the use of N-acetylcysteine (46), which has proven to be an important therapeutic potential for use in IR lesion (47).

### **N-Acetylcysteine**

Several authors have described different ways to increase the viability of lung graft post-transplantation and to reduce the undesirable effects of IR injury, including the use of antioxidants such as NAC and melatonin (47, 48).

NAC (chemical formula  $C_5H_9NO_3S$ ; molecular weight 163.2) is a thiol compound that contains a sulfhydryl group and is widely used in clinical medicine (49).

NAC is a mucolytic that was first implemented for treating congestive and obstructive lung diseases associated with hypersecretion. NAC is also used in the treatment of adult respiratory distress syndrome and in cases of acquired immunodeficiency in HIV infection (50). Its antioxidant activity is mainly governed by two mechanisms: 1) direct reduction of  $H_2O_2$  and  $O_2^{\cdot-}$  into less reactive species, forming sulfur or cysteine radicals; 2) promotion of the biosynthesis of GSH, which acts as a scavenger of free radicals and as a substrate in the redox cycle of glutathione (51).

The loss of antioxidant capacity in an oxidized cell is mainly due to a decrease in glutathione, which is the most abundant intracellular free thiol. Oxidative stress in vivo is translated as a deficiency in glutathione or its precursor, cysteine, and the most effective antioxidant that has been studied is the NAC, a glutathione precursor (52).

Chemically, NAC is similar to cysteine, and the presence of this acetyl environment reduces thiol reactivity compared to cysteine. Moreover, NAC is less toxic and less susceptible to oxidation and dimerization and is more soluble in water, making it a better source of cysteine than the parenteral administration of cysteine (53). NAC provides protection mediated by administration of lipopolysaccharide endotoxemia, resulting in a decrease in  $H_2O_2$ , and this was directly related to its ability to reduce ROS rather than its function of promoting the biosynthesis of glutathione (54). Many studies have demonstrated the effects of NAC, mainly with regard to modulating the activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS), reducing the formation of inflammatory cytokines and inhibiting the action of neutrophils (55-58). Furthermore, NAC acts as a "scavenger" of free radicals by inhibiting oxidative stress and preventing cell death (59).

Studies have demonstrated that treatment with NAC prior to lung warm ischemia significantly attenuates inflammatory changes in both the ischemic and reperfusion periods (60). NAC reduces the phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  and p-65, resulting in a decrease in apoptosis and inflammatory responses. The intravenous administration of NAC demonstrates protective properties against lung IR injury, and the use of NAC immediately after reperfusion potentiates its protective effects (61).

Study of Wu et al, demonstrated that the NAC administration reduced lung I/R-induced increases in myocardial hydroxyl radical production and lipid peroxidation, and ameliorated LV contractility and stiffening (62).

This protective effect could be explained by NAC increasing GSH synthesis or eliminating free radicals directly or both. The observed reduction in malondialdehyde (MDA) levels is consistent with the potent antioxidant effects of NAC, with a significant reduction in lipid peroxidation being reported by many researchers (63) (64, 65).

Current studies suggest the use of isoprostane as a more specific index of oxidative stress induced by ROS (66), (67) (68).

In experimental studies, treatment with NAC resulted in higher levels of tissue GSH, which led to improved lung graft function (52, 69).

### **Calcium and sodium pump in ischemia-reperfusion injury**

Ischemia causes an increase in calcium permeability by promoting its entry into cells. Such an increase in intracellular calcium, which is enhanced by a decrease in its active, ATP-dependent transport to the extracellular environment, has several deleterious effects: a change in cell shape by contraction of the cytoskeleton and phospholipase activation, with the consequent release of the metabolite arachidonic acid from cell membranes

and organelles, and the production of free radicals. All these effects contribute to cell death (70).

In addition to the increase in intracellular calcium as a result of ischemia, intracellular consumption occurs during the "storage" of ATP; hence, there is an increase in anaerobic glycolysis products. Such an event impairs the transmembrane ion gradient, with the consequent accumulation of sodium ( $\text{Na}^+$ ) and water, leading to cellular edema and the swelling of organelles, such as the mitochondria, culminating in cell lysis. Furthermore, the sodium pump ( $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ) is inactive during ischemia, contributing to the disruption of the ion gradient (71).

The accumulation of calcium ions ( $\text{Ca}^{++}$ ) intracellularly as a consequence of changes in the permeability of the plasma membrane and the decrease in active ATP-dependent transport results in the activation of phospholipases and proteases (72). Proteases potentiate the effects of ROS on organelles by converting xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase, and phospholipases activate the transformation of arachidonic acid into products such as leukotrienes, prostaglandins and thromboxane (72).

### **Endothelium in lung IR injury**

The endothelium is the main source of ROS during non-hypoxic pulmonary ischemia through the activation of NADPH oxidase. This enzyme complex is also found in other lung cells, but its concentration is more evident in neutrophils, monocytes and alveolar macrophages. Cell stimulation during ischemia results in the translocation of NADPH oxidase components to the cell membrane, a site where integration occurs with membrane components to form a system of electron transfer that catalyzes the reduction of molecular oxygen ( $\text{O}_2$ ) to superoxide radical ( $\text{O}_2^-$ ) while oxidizing NADPH. This increase in the consumption of  $\text{O}_2$  and production of  $\text{O}_2^-$  are responsible for the "oxidative burst" that results from the activation of NADPH. The  $\text{O}_2^-$  generated can be

subsequently transformed into  $H_2O_2$  in a reaction catalyzed by SOD. Oxidizing compounds are also produced by enzymes contained in intracellular granules. Azurophilic granules release the enzyme myeloperoxidase (12), which during neutrophil activation catalyzes the reaction between  $H_2O_2$  and chlorine to produce hypochloridric acid, which is considered to be an extremely potent oxidant. Furthermore, hypochloridric acid can react with amines, generating chloramines, which are considered potent oxidants (73).

Based on previous studies that demonstrated the presence of the enzyme xanthine dehydrogenase in endothelial cells and the ability of the cells to release ROS, these authors studied the effect of the presence of activated neutrophils in contact with these cells. They demonstrated that activated neutrophils induce the conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase in endothelium (74).

## **Iron**

Although iron is an essential element for all cells, it may be highly toxic under pathophysiological conditions, such as in the presence of oxidative stress, due to its oxidation-reduction properties (41).

The iron is mostly stored in ferritin molecules and is transported by transferrin molecules. However, "free" iron exists and can participate in Fenton's reaction, in which  $O_2$  and  $H_2O_2$  react with iron and produce OH radicals. Iron is released from ferritin and cytochrome P-450 during ischemia due to the effect of acidosis and through the action of superoxide radical and proteolysis. Moreover, when released into the circulation, iron can activate platelet aggregation. An experimental model of lung IR injury using 3 hours of warm ischemia in dogs showed that a new type of lazareid is able to reduce iron-dependent lipid peroxidation (75).

## Inflammatory mediators

Some inflammatory mediators released as a consequence of the reperfusion of an organ or similar such region can activate endothelial cells in distant organs that were not exposed to the ischemic insult but are injured as a result of reperfusion injury.

Moreover, reperfusion injury is characterized by autoimmune responses, including the recognition of natural antibodies and neoantigens and the subsequent activation of the complement (autoimmunity) system **(76)**. Despite the fact that IR typically occurs in a sterile environment, the activation of innate and adaptive immune response occurs and contributes to the injury, including the activation of pattern recognition molecules, such as Toll-like receptors (TLR), and the inflow of inflammatory cells in the injured organ **(77)**.

For example, when TLRs recognize specific molecules, they trigger the activation of signaling pathways, including the NF- $\kappa$ B activation of protein kinase (MAPK) pathways and type I interferon, which results in the induction of pro-inflammatory cytokines and chemokines. These receptors can also be activated by endogenous molecules in the absence of microbial compounds, particularly within the context of cell damage or death, as occurs during IR **(78)**. (Figure 2).

The recognition of “danger signals” by Toll-like receptors (TLRs) on the surface of inflammatory cells leads to the activation of different signaling pathways, including the NF- $\kappa$ B activation of protein kinase (MAPK) pathways and type I interferon, which results in the induction of proinflammatory cytokines and chemokines.

Specifically, the activation of TLR4 may be aggravated by the oxidative stress generated during IR, which when recognized by inflammatory cells, increases responsiveness to subsequent stimuli. Alveolar macrophages from rodents subjected to hemorrhagic shock and resuscitation express increased levels of TLR4, an effect that was inhibited by the addition of the antioxidant



NAC with fluid resuscitation (77). Andrade et al. examined the levels of TLR mRNA expression in lung tissue collected during IR in human lung transplantation and found that the mRNA levels of most TLRs correlate with the mRNA levels of cytokines (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 and IFN-gamma) in the lungs of donors during hypothermic storage. These observations suggest that inflammatory responses in the donor organ can affect the expression and activity of TLR genes; alternatively, the levels of expression and activation of TLRs may contribute to the regulation of cytokine gene expression. In addition, a close correlation between TL4 and IL-8 before and after reperfusion was found, suggesting that this cytokine may be involved in the regulation of TLR4 gene expression in the setting of lung transplantation (79).

TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), ROS and interleukin-6 (IL-6) are involved in the tissue damage that occurs during IR because they are toxic molecules that alter cellular proteins, lipids and ribonucleic acids, leading to cellular dysfunction or death (80). A further contribution to tissue injury occurs when the worsening of perfusion is potentiated by an imbalance in the production of vasoconstrictor and vasodilator factors. The hypoxic endothelium shows an increased production of potent vasoconstrictors (endothelin types 1, 2 and 3) and a decreased production of vasodilators (nitric oxide) (2).

The cellular damage generated by ROS in the lipid membrane promotes the activation of phospholipase A2 by inducing the production of platelet activating factor (PAF), which promotes the mobilization of arachidonic acid from the phospholipids of cell membrane. Arachidonic acid is the substrate for numerous enzymes and inside the lungs is primarily metabolized by two enzymes, cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, producing inflammatory mediators. The cyclooxygenase pathway generates prostaglandins (PGE1 and PGI2) and thromboxane (TXA 2), and the 5-lipoxygenase pathway produces leukotrienes, such as leukotriene B4, C4, D4 and E4 (81, 82).

Pulmonary vascular resistance depends on the interaction between vasoconstrictor and vasodilator factors. Most of the metabolites of arachidonic acid are derived from endothelial cells and contribute to maintaining low

vascular resistance in the lung. The effects of prostaglandins and thromboxanes are antagonistic. Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) is a bronchodilator, a pulmonary vasodilator and prevents platelet aggregation, whereas thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) is a broncho and vasoconstrictor and induces platelet aggregation (82).

Prostaglandins (PGE<sub>1</sub> and PGI<sub>2</sub>) are associated with the following effects: vasodilation and bronchodilation; the inhibition of platelet aggregation, leukocyte adhesion and sequestration; and the suppression of proinflammatory cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) production (12, 83, 84).

PAF can be released from various cells, such as macrophages, platelets, mast cells, endothelial cells and neutrophils, and is responsible for leukocyte activation, platelet aggregation, cytokine release and adhesion molecule expression (85). PAF acetylhydrolase is responsible for the degradation and regulation of the activity of PAF, and high levels of this enzyme were found in the bronchoalveolar lavage of patients with ARDS (86). Furthermore, it has been observed that when added to a lung preservation solution in an isolated perfused rat model, the substance has the ability to reduce pulmonary capillary permeability (87).

Leukotrienes, products of arachidonic acid metabolism by the 5-lipoxygenase pathway, are divided into two classes: cysteine (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, and LTE<sub>4</sub>) and non-cysteine (LTB<sub>4</sub>). LTB<sub>4</sub>, a potent proinflammatory activator of leukocyte chemotaxis that has an important role in lung IR injury, is produced by monocytes, lymphocytes, mast cells and lung macrophages (88).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor are central to the regulation of vascular permeability and the survival of endothelial cells. Mura et al suggested that VEGF may have dual roles in LPA-induced intestinal IR. The early release of VEGF can increase pulmonary permeability, whereas a decrease in the expression of VEGF and VEGFR-1 in lung tissue could contribute to the death of alveolar epithelial (4).

## **Nitric oxide**

Nitric oxide (NO) plays an important role in vascular homeostasis due to its potent vasoregulatory and immunomodulatory properties. It is known that NO attenuates the capillary overflow and tissue damage observed in animal models of pulmonary IR, myocardial and cerebral ischemia by inhibiting the adhesion of neutrophils and the production of superoxide by neutrophils (89).

NO is considered to be an optimal transcellular messenger due to its lipophilic nature and short half-life in biological systems, approximately 3 to 30 seconds (90).

NO is also a key biological mediator produced by various cell types, including vascular endothelium, is an inhibitor of platelet aggregation and neutrophil adhesion and modulates vascular permeability. Additionally, NO acts as a bronchodilator and neurotransmitter (84).

After pulmonary IR, the levels of endogenous NO are reduced. This may be associated with the increased expression of eNOS, which may suggest that endogenous NO production can be readily attenuated by free radicals after reperfusion and / or because IR can induce the generation of NOS inhibitors (91) (92).

The decreased production of endogenous NO by the immediate reaction of NO with the radical superoxide results in the production of a powerful oxidant, peroxynitrite (OONO). Such a loss of the protective action of NO will result in endothelial dysfunction (90).

## **Leukocyte activation**

IR injury in lung transplantation has a biphasic pattern. The early phase of reperfusion is mainly dependent on the characteristics of the donor, whereas the late phase is dependent on the characteristics of the recipient, lasting 24

hours. Donor macrophages activated during ischemia are the mediators of the early phase; lymphocytes and neutrophils from the recipient are mainly involved in the late phase. The recruitment of these cells occurs through the release of cytokines and other inflammatory mediators before and after reperfusion (93).

Alveolar macrophages produce large amounts of cytokines and procoagulant factors in response to oxidative stress. The importance of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (INF- $\gamma$ ) and chemo attractant protein-1 macrophage (equivalent to human IL-8) in the early phase of graft reperfusion was shown in a rat lung IR model (94).

Lymphocytes play an important role in pulmonary IR injury. The lung contains a large amount of donor macrophages and activated lymphocytes represented by T and natural killer cells, which are responsible for the graft-host immune response but also have beneficial immunomodulatory effects (95). In a rat lung transplant model, it was observed that CD4+ T lymphocytes are the mediators of IR injury and infiltrate the graft an hour after reperfusion, consequently increasing the production of IFN- $\gamma$ ; furthermore, it was suggested that this effect is independent of neutrophil recruitment and (24).

The role of leukocytes in lung reperfusion injury is due to the release of substances during their own degranulation, some of which are free radicals. Polymorphonuclear neutrophils possess nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase), which is capable of reducing molecular oxygen and generating superoxide anion (96).

These cells also secrete myeloperoxidase enzyme, which catalyzes the formation of hypochlorous acid (HOCl) from the oxidation of chloride ion in the presence of hydrogen peroxide. HOCl reacts with amines, generating chloramines, potent oxidants (97).

Neutrophils have the characteristic of infiltrating the transplanted lung progressively during the first 24 hours after reperfusion. Although these cells have an important role in the late phase of reperfusion injury, their role in the

early phase is less well known. Deeb et al. demonstrated that reperfusion injury in the first four hours depends of the presence of neutrophils, with macrophages also having an important role of at this stage; none the less, after this period, neutrophils are the primary mediators (98).

### **Apoptosis and lung ischemia-reperfusion injury**

Apoptosis is an active process, the hall mark of which is the controlled autodigestion of cellular constituents due to the activation of endogenous proteases and can be metaphorically be compared to "cell suicide". The activation of these proteases compromises the integrity of the cytoskeleton, causing the collapse of the cell structure. In response to the contraction of the cytoplasmic volume, the cell membrane forms bubbles, with changes in the positioning of the lipid components (99).

Nuclear NF- $\kappa$ B transcription is regulated by the inhibitory action of inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), which is targeted for degradation via phosphorylation by the action of I $\kappa$ B kinases (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ ) (100). Inflammatory signaling activates a cascade of events, such as the phosphorylation of the TNF receptor, leading to the activation of transforming-growth factor b-activated kinase 1 (TAK1). TAK1 phosphorylates the IKK complex and then phosphorylates I $\kappa$ B $\alpha$ , resulting in the ubiquitination and dissociation of I $\kappa$ B $\alpha$  from NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  degradation by the proteasome. NF- $\kappa$ B translocates to the nucleus and binds to specific DNA regions, initiating the transcription of multiple genes, including cytokines, chemokines and other inflammatory mediators (101).

Unlike what occurs with necrosis, apoptosis or programmed cell death does not occur during ischemia, but a peak of does occur during reperfusion (100). The induction of apoptosis can occur through two pathways. The intrinsic pathway is dependent on mitochondria and is activated by ROS, where as the extrinsic pathway is dependent on inflammatory molecules, such as TNF- $\alpha$ . However, by activating the production of ROS via the NADPH oxidase pathway,

TNF would also contribute to the intrinsic pathway (102). Both pathways promote the activation of caspases and proteases responsible for the cleavage of specific cellular substrates, which results in changes in cellular configuration, changes in membrane permeability and DNA fragmentation, with consequent cell death (103). The intrinsic pathway is activated in the early phase of reperfusion, and the extrinsic pathway can be activated up to a few hours after reperfusion (104). (Figure 3).

Phosphorylation of the TNF receptor (TNFR1 and TNFR2) leads to the activation of transforming-growth factor  $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1), which phosphorylates the protein I $\kappa$ B $\alpha$ , resulting in ubiquitination and leading to the dissociation of I $\kappa$ B $\alpha$  from NF- $\kappa$ B. TAK1 also leads to degradation of IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , releasing two subunits of p50 and p65; NF- $\kappa$ B translocates to the nucleus, initiating the transcription of multiple genes, including cytokines, chemokines and other inflammatory mediators. This occurs concomitant with the induction of apoptosis by the activation and induction of two pathways: the mitochondria-dependent intrinsic pathway is activated by ROS, and the extrinsic pathway is dependent on inflammatory molecules, such as TNF- $\alpha$ . The intrinsic pathway is activated in the early phase of reperfusion; the extrinsic pathway can be activated up to a few hours after pulmonary IR.

Apoptosis is regulated by a cascade of proteins called caspases, which are apoptosis effector proteins present in all cells. After cleavage, caspases become active and initiate pathways leading to apoptosis (105).

The following are features of apoptosis: chromatin condensation, phosphatidylserine exposure on the cell surface, cytoplasmic shrinkage, the formation of apoptotic bodies and fragmentation of DNA (106). As opposed to necrosis, which also occurs in the absence of ATP, apoptosis is an energy-dependent process (107).

Forgiarini et al demonstrated that the duration of ischemia has a direct effect on the viability of lung cells using an experimental model of lung IR. The

increase in caspase 3 activity reflected a larger number of apoptotic cells after 45 minutes of ischemia (108).

The signaling pathway that leads to programmed cell death is maintained by positive and negative regulators, and the balance between these factors decides whether the cell survives or undergoes apoptosis. The proteins that promote survival are the antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL, whereas proapoptotic proteins Bax, Bad, Bak and Bid induce programmed cell death (109).

An important regulator of apoptosis following DNA damage is p53, which can induce Bax and Bak, regulating the release of cytochrome C from mitochondria and thereby initiating the cascade leading to apoptosis (110). Cytochrome C binds to apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), activating caspase 9, which in turn cleaves caspases 3 and 6 (111, 112), leading to cell death (Figure4).

An important regulator of apoptosis is p53, which can induce Bax and Bak, which regulate the release of cytochrome C from mitochondria, thereby initiating the cascade that leads to apoptosis. Cytochrome C binds to apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1) to activate caspase 9, which cleaves caspases 3 and 6, leading to cell death.

### **Prevention and treatment of pulmonary IR injury**

Major advances in our understanding of the mechanisms of reperfusion injury and the development of strategies to increase tissue resistance to ischemia or to attenuate reperfusion injury have occurred. For example, experimental studies of adaptive responses induced by hypoxia have provided strong evidence for new treatment approaches in IR (38).

The tissue damage is not limited only to ischemia and may extend or worsen with reperfusion, and recognizing this is important for carefully reversing

ischemia, which is a critical point for maintaining tissue viability under damaging conditions (20).

Because of the pulmonary damage that IR causes, many studies in animal models have focused on the prevention of IR injury and the improvement of lung preservation methods (113-115), such as the use of lung hyperinflation (26, 116), hypothermic preservation (117), different lung preservation solutions (118, 119), retrograde pulmonary perfusion (118, 119), liquid ventilation [134] and perfluorocarbon (120, 121). These are in addition to the use of vasodilators (122, 123) antioxidants (124) gene therapy (125), inhaled nitric oxide (89), and ischemic preconditioning (PCI) (126).

All therapeutic options tested by different methods attempt to minimize or prevent the cell death that occurs during IR and consequently activate the various pathways of cell death, which can be categorized as necrosis, apoptosis or cell death associated with autophagy. Necrosis is characterized by the swelling of cells and organelles with the subsequent rupture of membranes and the surface and the shedding of intracellular contents (127).

Necrotic cells are highly immunostimulatory and cause inflammatory cell infiltration and cytokine production. In contrast, apoptosis involves a cascade of caspase signaling that induces programmed cell death, which is characterized by cell and nuclear shrinkage, though the integrity of the plasma membrane persists until the end of the process. Different studies have investigated whether the inhibition of apoptosis may become a promising therapeutic strategy for lung ischemia-reperfusion injury (128, 129) .

Some studies have investigated whether mice with a disruption in the gene encoding IKK $\beta$ , the catalytic subunit of IKK that is essential for the activation of NF- $\kappa$ B, can provide an opportunity to study the effects of preventing the activation of NF- $\kappa$ B. However, this manipulation results in embryonic lethality due to massive apoptosis in the developing liver driven by NF- $\kappa$ B(130). Ishiyama et al (131) studied the inhibition of NF- $\kappa$ B activation by applying inhibitors that prevented I $\kappa$ B phosphorylation and showed an increase



in the oxygenation of the transplanted lung and reductions in pulmonary edema, neutrophil aggregation and apoptotic cells after experimental lung transplantation.

Chang et al (103), demonstrated that the inhibition of NF- $\kappa$ B attenuates IR injury, as it is responsible for a reduction in cytokine production. In their study, the activation of NF- $\kappa$ B was responsible for the increased expression of caspase 3 and iNOS.

Another study on intestinal ischemia and reperfusion showed that although IKKb deficiency in enterocytes is associated with a reduction in inflammation, severe apoptotic damage occurs in the mucosa. Thus, attempts to inhibit the activation the NF-kB pathway are associated with the prevention of systemic injury but consequently increase local inflammation injury (132).

Certain calcium channel blockers are also used, such as verapamil, which has a protective effect during lung ischemia-reperfusion (133). In 1989, Wang et al. demonstrated that lung preservation at 10°C was greater than at 15°C and 4°C but that 4°C was a more appropriate temperature for the functioning of the sodium pump (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase (70).

Torres et al. suggested that the presence of LPD preservation solution in the systemic blood increases the plasma's total antioxidant potential, both in the presence and absence of a lung ischemic event. A decrease in erythrocyte LPD was also observed in the presence of lung ischemia (33).

Other evidence suggests that TLRs are involved in IR injury of different organs. In a study of myocardial ischemia-reperfusion injury, two strains of TLR4-deficient mice (C57/BL10 SCCR and C3H/HeJ) showed significantly smaller areas of myocardial infarction than control strains (C57/BL10 ScSn and C3H/OuJ). The TLR4-deficient mice also showed reduced neutrophil infiltration, reduced lipid peroxidation and reduced complement deposition in cardiac tissues (134) (135).

Some studies have used NO as an additional substance for lung preservation, and this has been shown to be effective in reducing the damage of reperfusion injury in various animal models (136-139). However, the use of

NO during lung reperfusion did not decrease pulmonary edema in a randomized clinical trial (89). In another study of 84 patients undergoing lung transplantation, the use of NO during reperfusion showed no benefit with respect to hemodynamics, extubation, the incidence of IR injury or the length of hospital and ICU stay (140). Ardehali and colleagues (141), demonstrated a benefit with the use of inhaled NO postoperatively a subgroup of patients who developed IR injury despite not decreasing its incidence (141).

## **Conclusion**

Over the years, several studies have investigated possible therapeutic alternatives that are deemed safe and with proven clinical efficacy. Although these alternatives may act directly on tissue damage triggered by ischemia and reperfusion, clear safety and effective evidence have yet been clinically demonstrated.

## **Future perspectives**

The search for different methods of lung protection is necessary and indispensable for testing different pharmacological approaches in an attempt to provide better therapeutic strategies for IR injury.

## **Acknowledgments**

This research was supported by grants from FIPE/HCPA (Hospital de Clinicas of Porto Alegre Institutional Research Fund). The authors acknowledge

the expert proofreading of this manuscript reviewing provided by the American Journal Expert.

## References

1. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
2. Pinheiro BV, Holanda MA, Araujo FG, Romaldini H. Lesão pulmonar de reperfusão. *J Pneumol*. 1999;25(2):124-36.
3. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine*. 2007;357(11):1121-35.
4. Mura M, Andrade CF, Han B, Seth R, Zhang Y, Bai XH, et al. Intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs. *Shock*. 2007;28(2):227-38.
5. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci*. 1994;307(4):284-92.
6. Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian-Macaulay A, Brett J, Stern D. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties. *J Clin Invest*. 1990;85(4):1090-8.
7. Menger MD. Microcirculatory disturbances secondary to ischemia-reperfusion. *Transplant Proc*. 1995;27(5):2863-5.
8. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
9. Jerome SN, Dore M, Paulson JC, Smith CW, Korthuis RJ. P-selectin and ICAM-1-dependent adherence reactions: role in the genesis of postischemic no-reflow. *Am J Physiol*. 1994;266(4 Pt 2):H1316-21.
10. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*. 2001;53(1):135-59.
11. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:67-101.
12. DeCampos KN, Keshavjee S, Liu M, Slutsky AS. Prevention of rapid reperfusion-induced lung injury with prostaglandin E1 during the initial period of reperfusion. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1998;17(11):1121-8.

13. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med.* 2011;17(7):796-808.
14. De Greef KE, Ysebaert DK, Ghielli M, Vercauteren S, Nouwen EJ, Eyskens EJ, et al. Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury. *J Nephrol.* 1998;11(3):110-22.
15. Oredsson S, Plate G, Qvarfordt P. Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury in skeletal muscle. *Eur J Surg.* 1994;160(2):97-103.
16. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc.* 1988;63(4):390-408.
17. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J.* 1999;138(2 Pt 2):S69-75.
18. King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, et al. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *The Annals of thoracic surgery.* 2000;69(6):1681-5.
19. Cooper JD, Patterson GA, Trulock EP. Results of single and bilateral lung transplantation in 131 consecutive recipients. Washington University Lung Transplant Group. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994;107(2):460-70; discussion 70-1.
20. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991;161(4):488-503.
21. Conte JV, Baumgartner WA. Overview and future practice patterns in cardiac and pulmonary preservation. *J Card Surg.* 2000;15(2):91-107.
22. Sun CK, Yen CH, Lin YC, Tsai TH, Chang LT, Kao YH, et al. Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells markedly reduced acute ischemia-reperfusion lung injury in a rodent model. *J Transl Med.* 2011;9:118.
23. Ucar G, Topaloglu E, Kandilci HB, Gumusel B. Effect of ischemic preconditioning on reactive oxygen species-mediated ischemia--reperfusion injury in the isolated perfused rat lung. *Clin Biochem.* 2005;38(7):681-4.
24. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2003;167(4):490-511.
25. Novick RJ, Gehman KE, Ali IS, Lee J. Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *The Annals of thoracic surgery.* 1996;62(1):302-14.

26. 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.
27. 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;105(3):480-91.
28. 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.
29. 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;79(1):147-54.
30. Rahman I, Marwick J, Kirkham P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(6):1255-67.
31. Al-Mehdi AB, Shuman H, Fisher AB. Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am J Physiol.* 1997;272(2 Pt 1):L294-300.
32. Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation.* 2005;79(5):505-14.
33. 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;57:309-11.
34. Kelly RF, Murar J, Hong Z, Nelson DP, Hong F, Varghese A, et al. Low potassium dextran lung preservation solution reduces reactive oxygen species production. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(6):1705-10.
35. Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O. Effect of lung ischemia--reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;29(3):294-8.
36. McMillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common pathway of endothelial-leukocyte interaction in shock, ischemia, and reperfusion. *Am J Surg.* 1993;166(5):557-62.
37. Salatti Ferrari R, da Rosa DP, Forgiarini LF, Bona S, Dias AS, Marroni NP. Oxidative stress and pulmonary changes in experimental liver cirrhosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:486190.

38. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nature medicine*. 2011;17(11):1391-401.
39. Grenz A, Clambey E, Eltzschig HK. Hypoxia signaling during intestinal ischemia and inflammation. *Current opinion in critical care*. 2012;18(2):178-85.
40. Park SW, Kim M, Brown KM, D'Agati VD, Lee HT. Paneth cell-derived interleukin-17A causes multiorgan dysfunction after hepatic ischemia and reperfusion injury. *Hepatology*. 2011;53(5):1662-75.
41. Zhao G, Ayene IS, Fisher AB. Role of iron in ischemia-reperfusion oxidative injury of rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;16(3):293-9.
42. Lee HT, Park SW, Kim M, D'Agati VD. Acute kidney injury after hepatic ischemia and reperfusion injury in mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2009;89(2):196-208.
43. Miranda LE, Capellini VK, Reis GS, Celotto AC, Carlotti CG, Jr., Evora PR. Effects of partial liver ischemia followed by global liver reperfusion on the remote tissue expression of nitric oxide synthase: lungs and kidneys. *Transplantation proceedings*. 2010;42(5):1557-62.
44. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 5):1147-50.
45. Paterson RL, Galley HF, Webster NR. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Critical care medicine*. 2003;31(11):2574-8.
46. Farber JL, Chien KR, Mitnacht S, Jr. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *The American journal of pathology*. 1981;102(2):271-81.
47. Inci I, Erne B, Arni S, Jungraithmayr W, Inci D, Hillinger S, et al. Prevention of primary graft dysfunction in lung transplantation by N-acetylcysteine after prolonged cold ischemia. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2010;29(11):1293-301.
48. Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kacmaz A, Arbak S, Ersoy Y, et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci*. 2003;72(24):2707-18.
49. Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother*. 1988;42(8):513-9.

50. Sarnstrand B, Tunek A, Sjodin K, Hallberg A. Effects of N-acetylcysteine stereoisomers on oxygen-induced lung injury in rats. *Chem Biol Interact.* 1995;94(2):157-64.
51. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989;6(6):593-7.
52. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(1):6-20.
53. Bonanomi L, Gazzaniga A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. *Eur J Respir Dis Suppl.* 1980;111:45-51.
54. Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AM, Aarsman CJ, van Oirschot JF, van der Bruggen T, van Asbeck BS. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 1998;157(4 Pt 1):1283-93.
55. Bakker J, Zhang H, Depierreux M, van Asbeck S, Vincent JL. Effects of N-acetylcysteine in endotoxic shock. *J Crit Care.* 1994;9(4):236-43.
56. Bergamini S, Rota C, Canali R, Staffieri M, Daneri F, Bini A, et al. N-acetylcysteine inhibits in vivo nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2001;5(4):349-60.
57. Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2000;47(3):537-48.
58. Turut H, Ciralik H, Kilinc M, Ozbag D, Imrek SS. Effects of early administration of dexamethasone, N-acetylcysteine and aprotinin on inflammatory and oxidant-antioxidant status after lung contusion in rats. *Injury.* 2009;40(5):521-7.
59. Kim YS, Jhon DY, Lee KY. Involvement of ROS and JNK1 in selenite-induced apoptosis in Chang liver cells. *Exp Mol Med.* 2004;36(2):157-64.
60. Geudens N, Van De Wauwer C, Neyrinck AP, Timmermans L, Vanhooren HM, Vanaudenaerde BM, et al. N-acetyl cysteine pre-treatment attenuates inflammatory changes in the warm ischemic murine lung. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation.* 2007;26(12):1326-32.
61. Forgiarini LF, Forgiarini LA, Jr., da Rosa DP, Silva MB, Mariano R, Paludo AD, et al. N-Acetylcysteine administration confers lung protection in different phases of lung ischemia-reperfusion injury. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2014.



62. Wu NC, Chen TH, Yang YC, Liao FT, Wang JC, Wang JJ. N-acetylcysteine improves cardiac contractility and ameliorates myocardial injury in a rat model of lung ischemia and reperfusion injury. *Transplantation proceedings*. 2013;45(10):3550-4.
63. Cakir O, Oruc A, Kaya S, Eren N, Yildiz F, Erdinc L. N-acetylcysteine reduces lung reperfusion injury after deep hypothermia and total circulatory arrest. *J Card Surg*. 2004;19(3):221-5.
64. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Filipe HM, Costantino G, Caputi AP, et al. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Shock*. 2000;14(2):150-6.
65. Davreux CJ, Soric I, Nathens AB, Watson RW, McGilvray ID, Suntres ZE, et al. N-acetyl cysteine attenuates acute lung injury in the rat. *Shock*. 1997;8(6):432-8.
66. Huang ZY, Xia ZY, Ansley DM, Dhaliwal BS. [Clinical significance of plasma free 15-F2t-isoprostane concentration during coronary artery bypasses graft surgery]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2004;16(3):165-8.
67. Mao X, Wang T, Liu Y, Irwin MG, Ou JS, Liao XL, et al. N-acetylcysteine and allopurinol confer synergy in attenuating myocardial ischemia injury via restoring HIF-1 $\alpha$ /HO-1 signaling in diabetic rats. *PLoS one*. 2013;8(7):e68949.
68. Wang T, Mao X, Li H, Qiao S, Xu A, Wang J, et al. N-Acetylcysteine and allopurinol up-regulated the Jak/STAT3 and PI3K/Akt pathways via adiponectin and attenuated myocardial postischemic injury in diabetes. *Free radical biology & medicine*. 2013;63:291-303.
69. Nakano H, Boudjema K, Alexandre E, Imbs P, Chenard MP, Wolf P, et al. Protective effects of N-acetylcysteine on hypothermic ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Hepatology*. 1995;22(2):539-45.
70. Waxman K. *Shock: ischemia, reperfusion, and inflammation*. New Horiz. 1996;4(2):153-60.
71. Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;159(3):980-8.
72. Okuda M, Lee HC, Chance B, Kumar C. Role of extracellular Ca<sup>2+</sup> in ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused rat liver. *Circ Shock*. 1992;37(3):209-19.
73. Chatterjee S, Fisher AB. ROS to the rescue. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(4):L704-5.

74. Rosen GM, Freeman BA. Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(23):7269-73.
75. Takeyoshi I, Iwanami K, Kamoshita N, Takahashi T, Kobayashi J, Tomizawa N, et al. Effect of lazareid U-74389G on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs. *J Invest Surg*. 2001;14(2):83-92.
76. Carroll MC, Holers VM. Innate autoimmunity. *Adv Immunol*. 2005;86:137-57.
77. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):826-37.
78. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum*. 1986;548:47-63.
79. Andrade CF, Kaneda H, Der S, Tsang M, Lodyga M, Chimisso Dos Santos C, et al. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25(11):1317-23.
80. Tian W, Liu Y, Zhang B, Dai X, Li G, Li X, et al. Infusion of mesenchymal stem cells protects lung transplants from cold ischemia-reperfusion injury in mice. *Lung*. 2015;193(1):85-95.
81. Uhlig S, Goggel R, Engel S. Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung. *Pharmacol Rep*. 2005;57 Suppl:206-21.
82. Farrukh IS, Michael JR, Peters SP, Sciuto AM, Adkinson NF, Jr., Freeland HS, et al. The role of cyclooxygenase and lipoxygenase mediators in oxidant-induced lung injury. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137(6):1343-9.
83. 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;72(9):1505-12.
84. Matsuzaki Y, Waddell TK, Puskas JD, Hirai T, Nakajima S, Slutsky AS, et al. Amelioration of post-ischemic lung reperfusion injury by prostaglandin E1. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148(4 Pt 1):882-9.
85. Drost EM, MacNee W. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur J Immunol*. 2002;32(2):393-403.
86. Grissom CK, Orme JF, Jr., Richer LD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Elstad MR. Platelet-activating factor acetylhydrolase is increased in lung lavage

fluid from patients with acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine*. 2003;31(3):770-5.

87. Baek SH, Kim JY, Choi JH, Park EM, Han MY, Kim CH, et al. Reduced glutathione oxidation ratio and 8 ohdG accumulation by mild ischemic pretreatment. *Brain Res*. 2000;856(1-2):28-36.

88. Yoshimura K, Nakagawa S, Koyama S, Kobayashi T, Homma T. Roles of neutrophil elastase and superoxide anion in leukotriene B4-induced lung injury in rabbit. *J Appl Physiol*. 1994;76(1):91-6.

89. 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*. 2006;129(4):1024-30.

90. Hart CM. Nitric oxide in adult lung disease. *Chest*. 1999;115(5):1407-17.

91. Marczin N, Riedel B, Gal J, Polak J, Yacoub M. Exhaled nitric oxide during lung transplantation. *Lancet*. 1997;350(9092):1681-2.

92. Le Cras TD, McMurtry IF. Nitric oxide production in the hypoxic lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(4):L575-82.

93. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, Laubach VE, et al. Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;121(6):1069-75.

94. Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol*. 1997;150(5):1773-84.

95. Richter N, Raddatz G, Steinhoff G, Schafers HJ, Schlitt HJ. Transmission of donor lymphocytes in clinical lung transplantation. *Transpl Int*. 1994;7(6):414-9.

96. Sperling J, Chebath J, Arad-Dann H, Offen D, Spann P, Lehrer R, et al. Possible involvement of (2'5')oligoadenylate synthetase activity in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(23):10377-81.

97. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil elastase and oxygen radicals: synergism in lung injury after hindlimb ischemia. *Am J Physiol*. 1991;260(6 Pt 2):H1852-6.

98. Bozok S, Ilhan G, Yilmaz Y, Dokumcu Z, Tumkaya L, Karamustafa H, et al. Protective effects of hyperbaric oxygen and iloprost on ischemia/reperfusion-induced lung injury in a rabbit model. *European journal of medical research*. 2012;17:14.

99. Parolin MB, Reason IJ. [Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases]. *Arq Gastroenterol.* 2001;38(2):138-44.
100. Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S, Vogt P, Odermatt B, Weder W, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation. *The Annals of thoracic surgery.* 2000;69(5):1532-6.
101. Souza JA, Rossa C, Jr., Garlet GP, Nogueira AV, Cirelli JA. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(2):128-38.
102. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica.* 2003;88(2):212-8.
103. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):821-46.
104. 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;22(2):147-9.
105. Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of clinical pathology.* 2004;57(10):1009-14.
106. van de Schepop HA, de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Counting of apoptotic cells: a methodological study in invasive breast cancer. *Clinical molecular pathology.* 1996;49(4):M214-7.
107. McClintock DS, Santore MT, Lee VY, Brunelle J, Budinger GR, Zong WX, et al. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death. *Molecular and cellular biology.* 2002;22(1):94-104.
108. Forgiarini JR L, Grün G, Kretzmann N, de Munoz G, Almeida A, Forgiarini L, et al. When is injury potentially reversible in a lung ischemiareperfusion model? *Journal of Surgical Research.* 2013;179(1):7.
109. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *The Journal of biological chemistry.* 1999;274(2):1156-63.
110. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001;292(5517):727-30.

111. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91(4):479-89.
112. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences*. 1997;22(8):299-306.
113. de Kerchove L, Boodhwani M, Etienne PY, Poncelet A, Glineur D, Noirhomme P, et al. Preservation of the pulmonary autograft after failure of the Ross procedure. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010;38(3):326-32.
114. de Perrot M, Keshavjee S. Lung preservation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;16(4):300-8.
115. Zhang YX, Fan H, Shi Y, Xu ST, Yuan YF, Zheng RH, et al. Prevention of lung ischemia-reperfusion injury by short hairpin RNA-mediated caspase-3 gene silencing. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139(3):758-64.
116. D'Armini AM, Roberts CS, Griffith PK, Lemasters JJ, Egan TM. When does the lung die? I. Histochemical evidence of pulmonary viability after "death". *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1994;13(5):741-7.
117. 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.
118. Alvarez A, Salvatierra A, Lama R, Algar J, Cerezo F, Santos F, et al. Preservation with a retrograde second flushing of Eurocollins in clinical lung transplantation. *Transplant Proc*. 1999;31(1-2):1088-90.
119. Chen CZ, Gallagher RC, Ardery P, Dyckman W, Low HB. Retrograde versus antegrade flush in canine left lung preservation for six hours. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1996;15(4):395-403.
120. Forgiarini LA, Jr., Forgiarini LF, da Rosa DP, Mariano R, Ulbrich JM, Andrade CF. Endobronchial perfluorocarbon administration decreases lung injury in an experimental model of ischemia and reperfusion. *J Surg Res*. 2013;183(2):835-40.
121. Forgiarini Junior LA, Holand AR, Forgiarini LF, da Rosa DP, Marroni NA, Cardoso PF, et al. Endobronchial perfluorocarbon reduces inflammatory activity before and after lung transplantation in an animal experimental model. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:193484.
122. Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, Hooper TL. Relative importance of prostaglandin/cyclic adenosine monophosphate and nitric oxide/cyclic

guanosine monophosphate pathways in lung preservation. *The Annals of thoracic surgery*. 1996;62(5):1494-9.

123. Bonser RS, Fragomeni LS, Jamieson SW, Fischel RJ, Harris KM, Edwards BJ, et al. Effects of prostaglandin E1 in twelve-hour lung preservation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1991;10(2):310-5; discussion 6.

124. Egan TM, Ulicny KS, Jr., Lambert CJ, Jr., Wilcox BR. Effect of a free radical scavenger on cadaver lung transplantation. *The Annals of thoracic surgery*. 1993;55(6):1453-9.

125. 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. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2000;120(5):947-56.

126. 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. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2008;34(8):583-9.

127. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med*. 2009;361(16):1570-83.

128. Thakar CV, Zahedi K, Revelo MP, Wang Z, Burnham CE, Barone S, et al. Identification of thrombospondin 1 (TSP-1) as a novel mediator of cell injury in kidney ischemia. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3451-9.

129. Tang Z, Arjunan P, Lee C, Li Y, Kumar A, Hou X, et al. Survival effect of PDGF-CC rescues neurons from apoptosis in both brain and retina by regulating GSK3beta phosphorylation. *J Exp Med*. 2010;207(4):867-80.

130. Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the I $\kappa$ B kinase 2 gene. *Science*. 1999;284(5412):321-5.

131. Ishiyama T, Dharmarajan S, Hayama M, Moriya H, Grapperhaus K, Patterson GA. Inhibition of nuclear factor kappaB by I $\kappa$ B superrepressor gene transfer ameliorates ischemia-reperfusion injury after experimental lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130(1):194-201.

132. Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, Karin M. The two faces of IKK and NF- $\kappa$ B inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nature medicine*. 2003;9(5):575-81.

133. Swoboda L, Clancy DE, Donnebrink MA, Rieder-Nelissen CM. The influence of verapamil on lung preservation. A study on rabbit lungs with a

reperfusion model allowing physiological loading. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;41(2):85-92.

134. Oyama J, Blais C, Jr., Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation.* 2004;109(6):784-9.

135. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant.* 2005;5(5):969-75.

136. Yamagishi H, Yamashita C, Okada M. Preventive influence of inhaled nitric oxide on lung ischemia-reperfusion injury. *Surg Today.* 1999;29(9):897-901.

137. 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;99(6):2423-32.

138. 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;54(7):477-83.

139. 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. *The Annals of thoracic surgery.* 2004;78(1):292-7.

140. 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. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2003;167(11):1483-9.

141. 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;72(1):112-5.

## FIGURES

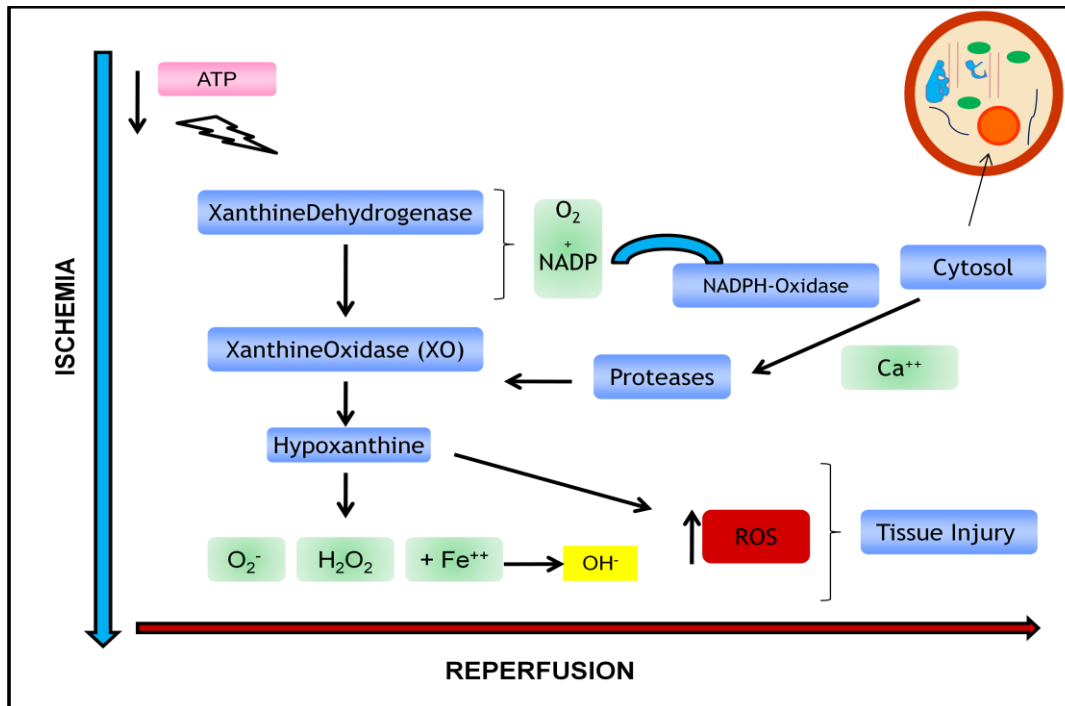


FIGURA 1: Formation of oxygen free radicals during lung ischemia and reperfusion injury.



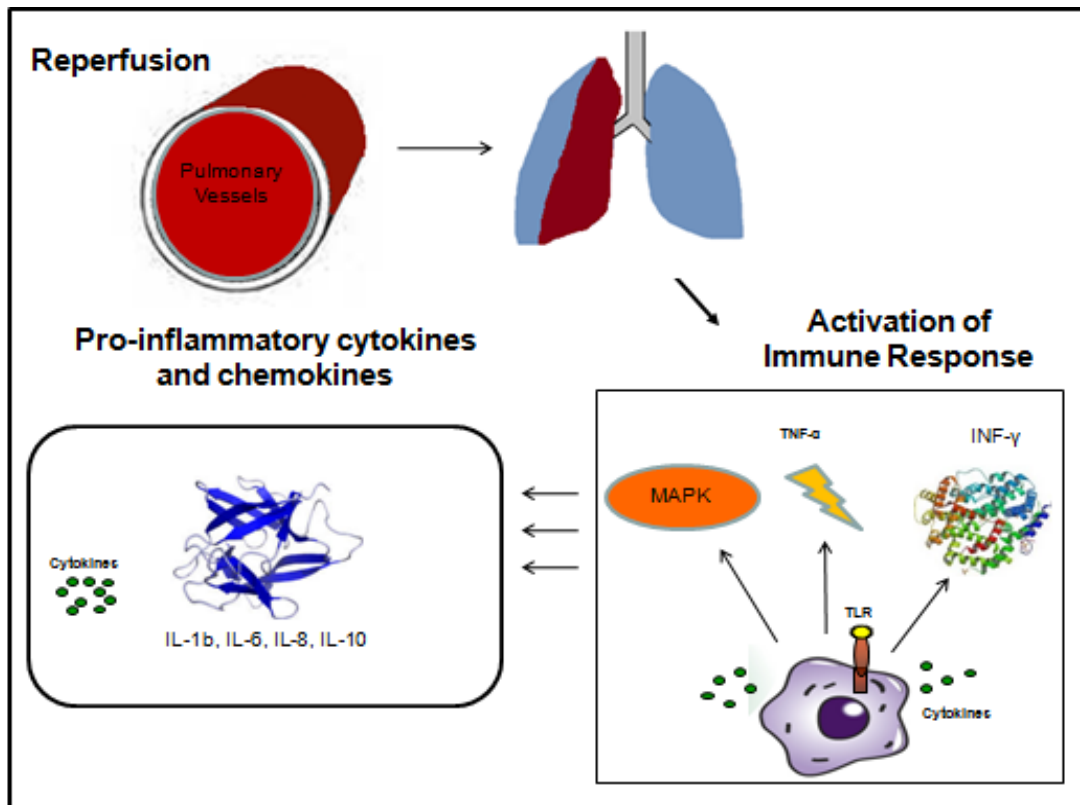


Figure 2: Activation of the immune response and trafficking of inflammatory cells in the diseased organ during reperfusion.

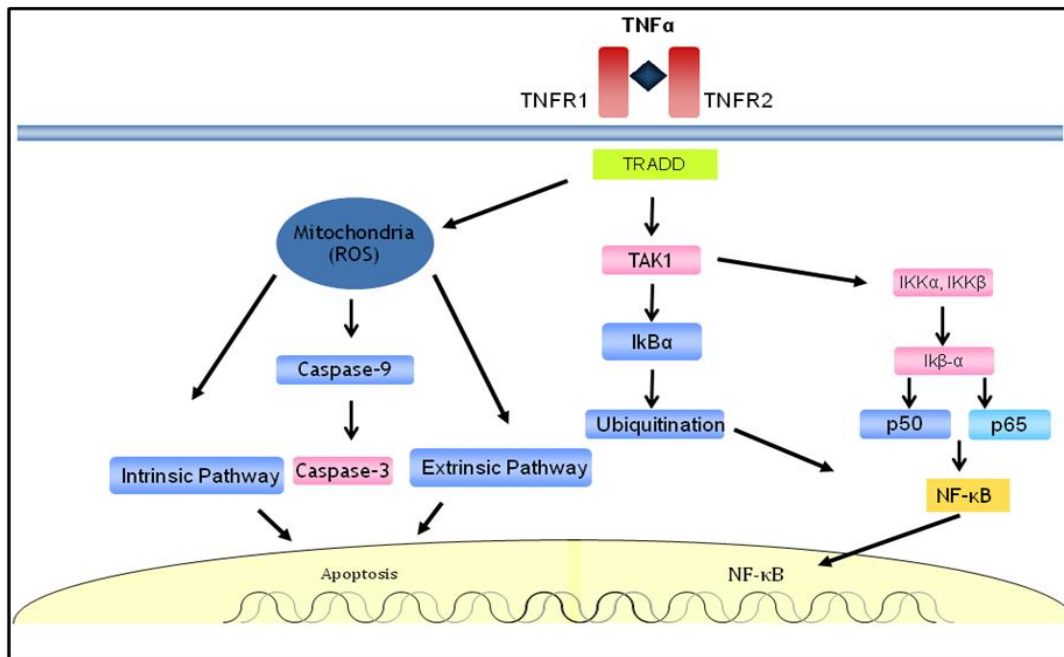


Figure 3: The transcription of nuclear NF- $\kappa$ B is regulated by the inhibitory action of the inhibitor protein I $\kappa$ B during ischemia-reperfusion injury.

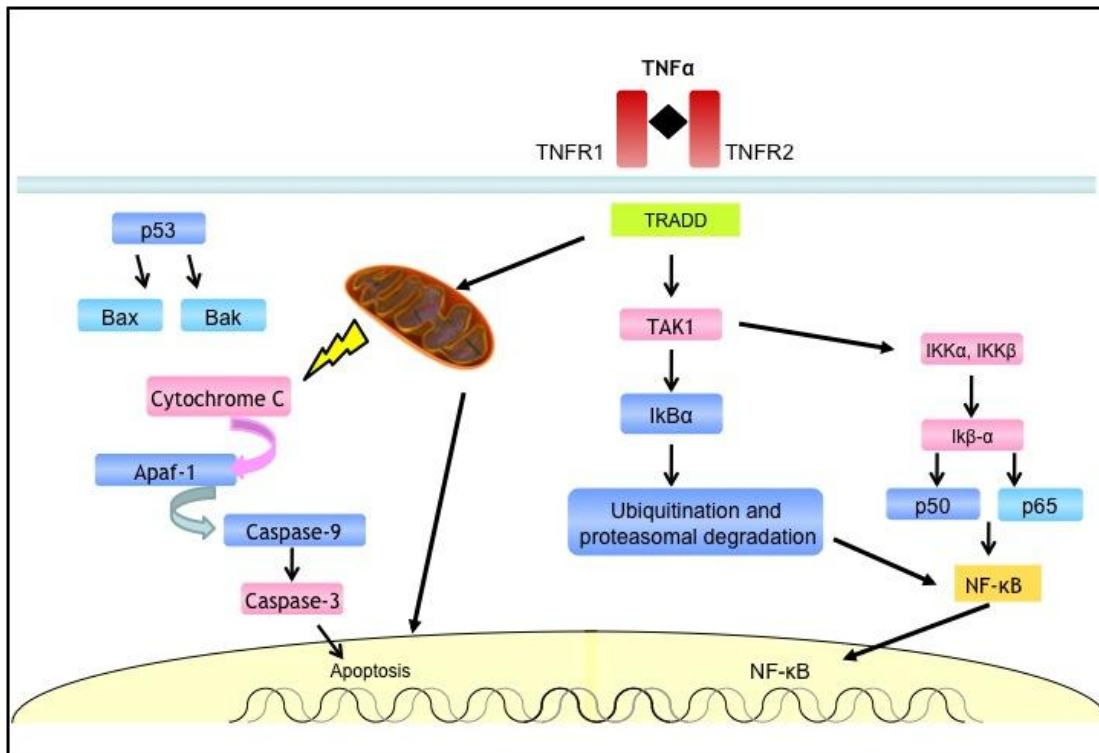


Figure 4: Release of cytochrome C from mitochondria triggers the activation of caspase 9, which cleaves caspases 3 and 6, leading to apoptosis.

## 7 Brief Communication

### **PERFLUOROCARBONO VAPORIZADO REDUZ O ESTRESSE OXIDATIVO NO PERÍODO DE ISQUEMIA FRIA DURANTE A PRESERVAÇÃO PULMONAR**

### **VAPORIZED PERFLUOROCARBON REDUCES OXIDATIVE STRESS DURING COLD ISCHEMIC TIME IN LUNG PRESERVATION**

Renata Salatti Ferrari<sup>1</sup>, Leonardo DallaGiacomassa Rocha Thomaz<sup>2</sup>, Lucas  
Elias Lise Simoneti<sup>2</sup>, Jane Maria Ulbrich<sup>3</sup>, Cristiano Feijó Andrade<sup>3</sup>

Renata Salatti Ferrari<sup>1</sup>, Programa de Pós Graduação em Ciências  
Pneumológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua  
Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar. Bairro Santana. CEP 90035-003 Porto  
Alegre-RS / Brasil. renatasalattiferrari@gmail.com

Leonardo DallaGiacomassa Rocha Thomaz<sup>2</sup>, Laboratório de Vias Aéreas e  
Pulmão - Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos,  
2350. Bairro Santa Cecília. CEP 90035-903 Porto Alegre-RS/Brasil.  
leorochat@hotmail.com

Lucas Elias Lise Simoneti<sup>2</sup>, Laboratório de Vias Aéreas e Pulmão - Hospital de  
Clinicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa  
Cecília. CEP 90035-903 Porto Alegre-RS/Brasil. lucaslise@hotmail.com

Jane Maria Ulbrich<sup>3</sup>, Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas  
– Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Ramiro Barcelos,  
2400 - 2º andar. Bairro Santana. CEP 90035-003 Porto Alegre-RS / Brasil.  
Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos, 2350.  
Bairro Santa Cecília. CEP 90035-903 Porto Alegre-RS/Brasil.

Cristiano Feijó Andrade<sup>4</sup>, Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar. Bairro Santana. CEP 90035-003 Porto Alegre-RS / Brasil. Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa Cecília. CEP 90035-903 Porto Alegre-RS/Brasil. cristianofofa@gmail.com

Correspondência ao autor: Renata Sallati Ferrari

Endereço Postal: Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa Cecília. CEP 90035-903 Porto Alegre-RS/Brasil. leorochat@hotmail.com

e-mail: renatasallatiferrari@gmail.com

Telefone: +55 51 996366999

Órgão financiador: Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Resumo:**

A instilação de perfluorocarbono (PFC) líquido tem sido estudada experimentalmente como uma substância adjuvante na preservação de enxertos pulmonares durante o período de isquemia fria. O objetivo deste estudo é avaliar se o PFC vaporizado também atuaria como protetor de enxertos pulmonares em diferentes tempos de isquemia fria. Realizamos análise histológica e dosamos estresse oxidativo em pulmões de animais que receberam somente solução de preservação com baixo potássio dextran (LPD) ou PFC vaporizado associado a LPD. Concluímos que o PFC vaporizado reduz a produção de radicais livres e provoca menos alterações estruturais pulmonares decorrentes do período de isquemia fria.

**Abstract**

Liquid perfluorocarbon (PFC) instillation has been studied experimentally as an adjuvant therapy in preservation of pulmonary grafts during the cold ischemic period. The objective of this study was to evaluate whether the vaporized PFC would also act as a protective substance of pulmonary grafts in different times of cold ischemia. We performed histological analysis and we measured oxidative stress in lungs of animals that received only preservation solution with low potassium dextran (LPD) or vaporized PFC associated with LPD. We conclude that the vaporized PFC reduces the production of free radicals and causes fewer pulmonary structural changes resulting from the cold ischemic period.

**Descritores:** Isquemia/ reperfusão; Perfluorocarbono; Transplante pulmonar; Estresse oxidativo

**Keywords:** Ischemia/reperfusion; Perfluorocarbon; Lung Transplantation; Oxidative Stress

## Introdução

Diferentes métodos e substâncias tem sido testados experimentalmente para melhorar a preservação pulmonar durante o período de isquemia fria, como surfactante pulmonar, perfluorocarbono líquido, inibidores do complemento, sulfureto de hidrogênio inalado, nitritos, óxido nítrico inalado (1, 2). No entanto, o método de preservação pulmonar para transplante ainda continua sendo a utilização de solução fria de LPD por via da artéria pulmonar (perfusão anterógrada) e/ou veias pulmonares (perfusão retrógrada), associado ao uso de vasodilatadores pulmonares e armazenamento do pulmão em estado semi-inflado com oxigênio (2). O uso de PFC vaporizado parece ser uma alternativa interessante na preservação pulmonar para transplante, uma vez que seu uso em estado líquido tem demonstrado proteção aos pulmões transplantados antes e após a reperfusão (3-5). Os potenciais benefícios do PFC vaporizado na preservação pulmonar seriam sua capacidade de transportar oxigênio e dióxido de carbono e por possuir propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidantes (6-8). Além disso, na sua forma vaporizada, o PFC é facilmente distribuído a todo o pulmão em uma forma mais uniforme e sobretudo não apresenta as dificuldades de ventilação daqueles pulmões enxarcados com PFC líquido. Para verificar os efeitos do PFC vaporizado durante a preservação pulmonar utilizamos um modelo animal de isquemia fria para análise do estresse oxidativo e das alterações histológicas nos pulmões preservados em diferentes períodos de tempo. Este foi um estudo experimental controlado envolvendo ratos Wistar com um peso corporal médio de 300 g. Todos os animais foram tratados de acordo com o Código Ético da Organização Mundial de Saúde para Experimentação Animal. Os animais foram divididos em 8 grupos, cada um compreendendo 6 animais de acordo com o procedimento cirúrgico: PFC + LPD 3 horas, PFC + LPD 6 horas, PFC + LPD 12 horas, PFC + LPD 24 horas, LPD 3 horas, LPD 6 horas, LPD 12 horas, LPD 24 horas. Em ambos os grupos, utilizou-se uma dose de 7mL/Kg de PFC vaporizado em cânula de traqueotomia conectada a um equipamento de anestesia, após o período de reperfusão de 120 min, os animais foram sacrificados após terem sido anestesiados com cetamina i.p. (100 mg/kg) e

xilazina (50 mg/kg). Posteriormente, realizou-se uma laparotomia ventral média. Os pulmões foram removidos e fixados em para formaldeído a 4% para análise histológica e armazenados a -80°C para posteriormente quantificar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e avaliar a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Para realizar a análise bioquímica, o tecido pulmonar foi homogeneizado (12), após o qual os níveis de proteína foram quantificados de acordo com Lowry et al. (9). A medição do TBARS foi realizada conforme estabelecido pela Buege & Aust. (10) e a determinação da atividade de SOD foi realizada de acordo com a técnica descrita por Misra & Fridovich (11). A análise da atividade da catalase foi baseada na mensuração da redução do peróxido de hidrogênio (12). As amostras para análise histológica do tecido pulmonar foram coletadas e armazenadas durante 12 horas em solução de formaldeído a 10%, transferidas para álcool a 70% e coradas com H&E. O exame anatomopatológico foi realizado por um patologista de forma cegada. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico SPSS versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). Utilizou-se ANOVA seguida do teste post-hoc de Tukey, no caso de variâncias desiguais ou distribuição anormal, foi realizado um teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de testes U de Mann-Whitney para comparações intergrupos. Em todas as comparações, o nível de significância foi estabelecido em 5%. Os pulmões preservados por 3 e 6 horas, utilizando uma dose de 7ml/kg de PFC vaporizado, apresentaram um aumento significativo da concentração da enzima superóxido dismutase quando comparada ao grupo LPD. Não verificamos uma diferença significativa nos níveis de TBARS e CAT entre os grupos (Tabela).

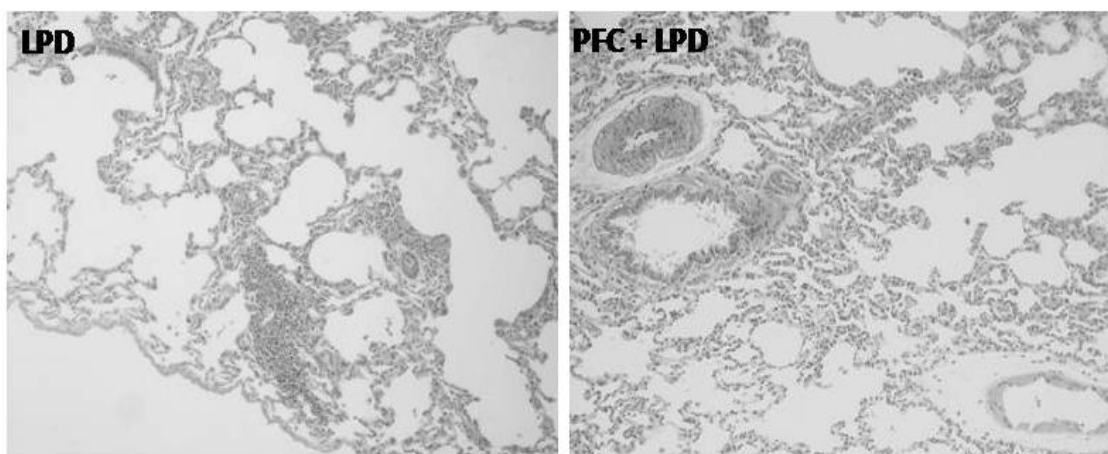
**Tabela-** Comparação entre o grupo PFC + LPD e o grupo LPD em relação à peroxidação lipídica, catalase e superóxido dismutase.



	TBARS nmol/mg proteína	CAT pmoles/mg of proteína	SOD IU/mg proteína
PFC + LPD 3	0,140 ± 0,055	0,112 ± 0,098	4,938 ± 1,137*
PFC + LPD 6	0,372 ± 0,049	0,179 ± 0,055	3,841 ± 1,364*
PFC + LPD 12	0,585 ± 0,038	0,177 ± 0,071	3,540 ± 1,312
PFC + LPD 24	0,838 ± 0,031	0,125 ± 0,072	4,610 ± 1,499
LPD 3	0,421 ± 0,241	0,114 ± 0,067	2,874 ± 0,222
LPD 6	0,154 ± 0,030	0,073 ± 0,012	2,434 ± 0,030
LPD 12	1,498 ± 0,527	0,086 ± 0,057	2,940 ± 0,257
LPD 24	0,917 ± 0,360	0,056 ± 0,009	3,776 ± 1,496

TBARS: substância reativas ao ácido tiobarbitúrico; CAT: catalase; SOD: enzima superóxido dismutase. Valores expressos como média ± DP. \*p < 0.05. \* PFC + LPD 3 vs LPD 3 and \* PFC + LPD 6 vs LPD 6.

Na histologia evidenciamos a presença de infiltrado intersticial, processo inflamatório crônico intersticial e atelectasias nos pulmões dos grupos preservados por 3, 6, 12 e 24 horas no grupo LPD. No grupo PFC + LPD observamos apenas a presença de atelectasias, o que demonstra que a utilização de PFC vaporizado reduz o dano estrutural pulmonar durante os diferentes tempos de isquemia fria. (Figura).



**FIGURA:** Fotomicrografias de amostras do tecido pulmonar após 24 horas de isquemia fria. Presença de maior processo inflamatório em pulmão perfundido com LPD quando comparado a pulmão submetido a PFC vaporizado e LPD. (20X) LPD: Baixo Potássio e Dextran; PFC + LPD: Perfluorocarbono + Baixo Potássio e Dextran

Nossos resultados mostraram que o PFC vaporizado administrado

concomitantemente com a ventilação mecânica foi capaz de reduzir o estresse oxidativo no período inicial de isquemia fria em até 6 horas de preservação pulmonar, comprovando então o seu efeito anti-oxidante. Achados semelhantes foram obtidos por Forgiarini et. al, que avaliaram o efeito do PFC líquido em um modelo de transplante pulmonar em ratos, neste estudo os autores avaliaram estresse oxidativo em diferentes tempos de isquemia e também após o transplante pulmonar, onde encontraram um aumento da atividade de SOD e sem diferenças significativas com relação aos níveis de TBARS (4). O PFC líquido tem a característica de manutenção da estrutura alveolar, mesmo quando submetido a lesão pulmonar em modelo de isquemia e reperfusão por clampeamento do hilo pulmonar (3) ou modelo de transplante pulmonar (4). Forgiarini et al testaram diferentes doses de PFC líquido e demonstraram que utilizando uma dose de 7ml/kg havia uma melhor manutenção da estrutura alveolar sem rompimento de septos alveolares. Nosso estudo demonstrou que mesmo em estado de vapor o PFC apresenta propriedades semelhantes ao PFC na proteção da estrutura alveolar. Apesar dos resultados preliminares do nosso estudo, esta é primeira vez que o PFC vaporizado foi testado como substância adjuvante na preservação pulmonar durante o período de isquemia fria, sugerindo que há proteção da estrutura alveolar e propriedades anti-oxidativas. Por isso faz-se a necessidade de estudos mais detalhados em relação a verdadeiro papel do PFC vaporizado tanto na preservação pulmonar para transplante como também na fase de reperfusão pós transplante.

## Referências

1. Cypel M. A new era in lung transplantation: an individualized approach to donor lungs. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2012;38(6):681-3.
2. Andrade CF, Kaneda H, Der S, Tsang M, Lodyga M, Chimisso Dos Santos C, et al. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2006;25(11):1317-23.
3. Forgiarini LA, Jr., Forgiarini LF, da Rosa DP, Mariano R, Ulbrich JM, Andrade CF. Endobronchial perfluorocarbon administration decreases lung injury in an experimental model of ischemia and reperfusion. *J Surg Res*. 2013;183(2):835-40.
4. Forgiarini Junior LA, Holand AR, Forgiarini LF, da Rosa DP, Marroni NA, Cardoso PF, et al. Endobronchial perfluorocarbon reduces inflammatory activity before and after lung transplantation in an animal experimental model. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:193484.
5. Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:590987.
6. Wang X, Zhang J, Li X, Liu Y, Yang H, Zhao X, et al. Sustained improvement of gas exchange and lung mechanics by vaporized perfluorocarbon inhalation in piglet acute lung injury model. *The clinical respiratory journal*. 2014;8(2):160-6.
7. Hubler M, Souders JE, Shade ED, Polissar NL, Schimmel C, Hlastala MP. Effects of vaporized perfluorocarbon on pulmonary blood flow and ventilation/perfusion distribution in a model of acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology*. 2001;95(6):1414-21.
8. de Abreu MG, Quelhas AD, Spieth P, Brauer G, Knels L, Kasper M, et al. Comparative effects of vaporized perfluorohexane and partial liquid ventilation in oleic acid-induced lung injury. *Anesthesiology*. 2006;104(2):278-89.
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
10. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*. 1978;52:302-10.

11. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*. 1972;247(10):3170-5.
12. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 1984;105:121-6.

## 8. ARTIGO 3

### ARTIGO NAS NORMAS DO JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH

#### VAPORIZED PERFLUOROCARBON REDUCES INFLAMMATORY ACTIVITY DURING LUNG ISCHEMIA REPERFUSION INJURY

Renata Salatti Ferrari<sup>1</sup>, Leonardo Dalla Giacomassa Rocha Thomaz<sup>2</sup>, Lucas Elias Lise Simoneti<sup>2</sup>, Aline Morás Borges<sup>1</sup>, Graziela Hünning Pinto<sup>3</sup>, José Ignácio Gonzalez Solari<sup>1</sup>, Carolina Cohen<sup>3</sup>, Cristiano Feijó Andrade<sup>4</sup>

Renata Salatti Ferrari<sup>1</sup>, Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar. Bairro Santana. CEP 90035-003 Porto Alegre-RS / Brasil. renatasallatiferrari@gmail.com

Leonardo Dalla Giacomassa Rocha Thomaz<sup>2</sup>, Laboratório de Vias Aéreas e Pulmão - Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa Cecília. CEP 90035-903 Porto Alegre-RS/Brasil. leorochat@hotmail.com

Lucas Elias Lise Simoneti<sup>2</sup>, Laboratório de Vias Aéreas e Pulmão - Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa Cecília. CEP 90035-903 Porto Alegre-RS/Brasil. lucaslise@hotmail.com

Aline Morás Borges<sup>1</sup>, Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar. Bairro Santana. CEP 90035-003 Porto Alegre-RS / Brasil. aline.moras@hotmail.com

Graziela Hünning Pinto<sup>3</sup>, Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa Cecília. CEP 90035-903 Porto Alegre-

RS/Brasil. graziela.biomedic@gmail.com

José Ignacio Gonzalez Solari<sup>1</sup>, Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar. Bairro Santana. CEP 90035-003 Porto Alegre-RS / Brasil. Nachosolari\_2@hotmail.com

Carolina Cohen<sup>3</sup>, Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa Cecília. CEP 90035-903 Porto Alegre-RS/Brasil. ccohen@hcpa.edu.br

Cristiano Feijó Andrade<sup>4</sup>, Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar. Bairro Santana. CEP 90035-003 Porto Alegre-RS / Brasil. Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa Cecília. CEP 90035-903 Porto Alegre-RS/Brasil. cristianofoa@gmail.com

Corresponding author: Renata Sallati Ferrari

Postal Address: Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa Cecília. CEP 90035-903 Porto Alegre-RS/Brasil. leorochat@hotmail.com

e-mail: [renatasallatiferrari@gmail.com](mailto:renatasallatiferrari@gmail.com)

Phone Numbers: +55 51 996366999

Author contributions:

Renata Salatti Ferrari: Conception and development from the idea to the article; bibliographic survey; supervision (responsible for the organization and execution of the project and writing of the manuscript), organization, analysis and interpretation of the data; wording (responsible for writing a substantive part of the manuscript).

Leonardo Dalla Giacomassa Rocha Thomaz: Collection and processing of data (responsible for experiments)

Lucas Elias Lise Simoneti: Collection and processing of data (responsible for experiments)

Aline Morás Borges: Wording (responsible for writing a substantive part of the manuscript).

Graziela Hünning Pinto: Collection and processing of data (responsible for biochemical analyzes).

José Ignacio Gonzalez Solari: Collection and processing of data (responsible for biochemical analyzes).

Carolina Cohen: Collection and processing of data (responsible for biochemical analyzes).

Cristiano Feijó Andrade: Conception and development from the idea to the article, analysis and interpretation of the data, critical review (reviewed the intellectual content of the manuscript before the final presentation).

#### Abstract

**Objective:** To verify the effects of vaporized perfluorocarbon (PFC) administered before and after reperfusion in an animal model of lung ischemia reperfusion injury.

**Methods:** Twenty-four male Wistar rats were subjected to an experimental model of lung ischemia-reperfusion injury. The animals were divided in four groups: Sham, ischemia-reperfusion (IR), vaporized perfluorocarbon pre-ischemia-reperfusion (PFC PRE-IR) and vaporized perfluorocarbon post-ischemia-reperfusion (PFC POST-IR). We recorded hemodynamics parameters, blood gases and histology. Western Blot assay was used to measure iNOS, interleukin 6, Caspase 3 and NF- $\kappa$ B (sub-unit p65) activity; evaluation of lipid peroxidation and activity of antioxidants enzymes.

**Results -** There was a significant increase in NF- $\kappa$ B expression in PFC PRE-IR

and PFC POST-IR groups vs sham group ( $p<0.05$ ) and an increase in IL-6 expression in the IR group vs SHAM group ( $p<0.05$ ), however in the other groups the PFC attenuated the IL-6 expression when compared to IR group ( $p<0.05$ ). In groups PFC PRE-IR and PFC POST-IR we observed a reduced caspase 3 expression vs IR group ( $p<0.05$ ). There was an increase in iNOS expression in the IR group vs group SHAM ( $p<0.05$ ). The PFC attenuated the iNOS expression in the PFC PRE-IR group when compared to IR group ( $p<0.05$ ). We observed a significant decreased in PaO<sub>2</sub> levels in the IR vs SHAM group ( $p<0.05$ ) and subsequent increase in PaO<sub>2</sub> levels in PFC POST-IR group ( $p<0.05$ ).

Conclusion: Vaporized PFC has protective effect on lung tissue, reducing the inflammatory response caused by IR injury.

Keywords: Reperfusion Injury; Lung Injury; Fluorocarbons; Pulmonary Surgical Procedures; Thoracic Surgery; Models, Animal



## Introduction

The process of ischemia and subsequent reperfusion is present in many medical situations such as major surgical procedures and organ transplantation. This event may lead to devastating consequences in some patients; therefore, the understanding of this process is extremely important in the search for new therapies and procedures that could reduce tissue injury (1-3).

Pulmonary ischemia during donor organ retrieval and transplantation is associated with ischemia-reperfusion injury (IR), resulting in endothelial cell damage, increase in reactive oxygen species (ROS), surfactant dysfunction (4, 5) and induction of pro-inflammatory signaling pathways (6) that may lead to apoptosis and eventually cell death. Additionally, tissue damage is not limited to ischemia and may extend or worsen with reperfusion, therefore its prompt recognition is important in order to minimize the deleterious effects of this process, which is fundamental to the maintenance of tissue viability (7-10)

Liquid perfluorocarbon (PFC) administered endobronchially or vaporized has been studied as a lung protective substance in humans with acute respiratory distress syndrome (ARDS) and in different models of lung injury . 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, the use of vaporized PFC in lung injury models has shown to reduce lung damage and improve pulmonary oxygenation without the undesirable effects of its liquid state into the lungs (12, 13).

The objective of this study is to verify the effects of vaporized perfluorocarbon (PFC) administered before and after reperfusion in an animal model of lung ischemia reperfusion injury and evaluate whether the use of vaporized perfluorocarbon reduces inflammatory response and apoptosis formation.

## 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 of Clínicas, approved the experimental protocols. Twenty four male Wistar rats were randomized in 4 groups (n = 6) according to the surgical procedure: SHAM group, ischemia-reperfusion group (IR), vaporized perfluorocarbon pre-ischemia-reperfusion group (PFC PRE-IR), vaporized perfluorocarbon post-ischemia-reperfusion group (PFC POST-IR).

The animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) via intraperitoneal injections, trichotomized and underwent cervical tracheotomy with a plastic cannula (Abbocath #14, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). 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 2cmH<sub>2</sub>O.

The animals were submitted to a left thoracotomy as described elsewhere. Just before selective arterial clamping, lung expansion was achieved through occlusion of the expiratory valve for three inspiratory cycles, in order to avoid atelectasis(14). During the clamping of the pulmonary artery, the animal was maintained on mechanical ventilation in both lungs.

Mean systemic arterial pressure (MAP) was measured through cannulation of the right carotid artery just after tracheal cannulation (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). The MAP was measured during all long the experiment. Two blood samples were collected. One before thoracotomy and another at the end of two hours of reperfusion or as occurred at the SHAM group two hours after hilar manipulation. The MAP was measured during all long the experiment.

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 hilum was isolated. In the IR, PFC PRE-IR and PFC POST-IR groups 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 PFC PRE-IR and PFC POST-IR group, we performed the same surgical procedure as described to the IR group. However in both groups we used a dose of 7mL/Kg of vaporized PFC in the tracheotomy cannula, before (PFC PRE-IR) and after (PFC POST-IR) the IR injury. The PFC PRE-IR group was ventilated with vaporized PFC for 30 minutes before left pulmonary hilum clamping. Just after clamp release the PFC POST-IR group was ventilated with vaporized PFC for two hours. After the 120-min period of reperfusion (IR, PFC PRE-IR and PFC POST-IR) or observation (15), the animals were sacrificed. Thus, the left lung was removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  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  $100^{\circ}\text{C}$ , 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 (16).

### **Superoxide Dismutase**

Cytosolic superoxide dismutase was assayed according to Misra and Fridovich at 30° (17). 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 NFκB p65 (NFκB p65 (F-6): sc-8008), IL-6 (10E5): sc-57315), caspase-3 (H-277: sc-7148) and iNOS (NOS2 (C-11): sc-7271) - (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) expression by immunoblot analysis. Band density was determined using a GS-700 Imaging Densitometer and analyzed with Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) (18, 19).

### **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 61 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.

## **Lung Histology**

Lung tissue specimens were fixed in formalin and dehydrated, cleared, and embedded in paraffin. Specimens were cut into 8- $\mu$ 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 semi quantitatively 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 (20).

## Statistical Analysis

The results in text, tables and figures are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Data was analyzed using SPSS version 22.0 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

In our study we found an increase of NF- $\kappa$ B (subunit p65) expression in lung tissue in IR group when compared to p SHAM group ( $p<0.05$ ). However in PFC PRE-IR and PFC POST-IR groups we observed a significant reduction in NF- $\kappa$ B expression when compared to IR group ( $p<0.05$ ) (Figure 1).

There was an increase in IL-6 expression in lung tissue in the IR group when compared to SHAM group ( $p<0.05$ ). Interestingly, in PFC PRE-IR and PFC POST-IR groups IL-6 expression was attenuated when compared to IR group ( $p<0.05$ ) (Figure 2).

Overexpression of caspase 3 was found in the IR group when compared to SHAM group ( $p<0.05$ ). PFC PRE-IR and PFC POST-IR groups showed a lower caspase 3 expression when compared to IR group ( $p<0.05$ ) (Figure 3 and 4).

Increased expression of iNOS was observed in the IR group when compared to SHAM group ( $p<0.05$ ). PFC attenuated iNOS expression in the PFC PRE-IR group when compared the IR group ( $p<0.05$ ) (Figure 5).

There were no differences in blood gases analysis among the groups at baseline. However, at the end of the experiment, there was a significantly decreased in PaO<sub>2</sub> levels in IR group when compared to SHAM group ( $p < 0.05$ ) and subsequent increase in PaO<sub>2</sub> levels in PFC POST-IR group ( $p < 0.05$ ) (Figure 6).

We observed a significant reduction of the anti-oxidant SOD enzyme in the IR group, which was increased in the PFC groups, however with similar values to the SHAM group ( $p < 0.05$ ) (Figure 6). There were no significant differences in lipid peroxidation (TBARS) and in the anti-oxidant CAT enzyme.

Histology of the lungs in the IR group showed severe changes in lung morphology characterized by perivascular edema, intra alveolar hemorrhage, cellular infiltrates, and atelectasis, which were also observed in PFC groups although with less severe alterations. The analysis of the severity of histological damage using the histology score (HIS), showed a statistically significant reduction in lung injury in the PFC groups when compared with the IR group ( $p < 0.05$ ) (Figure 7).

## **Discussion**

In a model of lung ischemia reperfusion injury the use of vaporized PFC before and after reperfusion was able to reduce inflammatory activity, minimize apoptosis induction, improve gas exchange and protect the lungs against the harmful effects of reperfusion.

In our study, both PFC groups were able to reduce the phosphorylation of p-65, resulting in a decrease in the apoptotic and inflammatory responses. The transcription factor NF- $\kappa$ B may modulate apoptosis during IR (14) and a non activation of this protein in both of the PFC groups could explain the protection against apoptosis, as shown by Forgiarini et al using a similar model with liquid PFC (3). These authors, using endobronchial PFC instillation in an IR

model showed reduction of several inflammatory mediators such as NF- $\kappa$ B, Caspase 3, iNOS, demonstrating PFC ability to improve lung preservation and reducing the deleterious effects of IR injury (3).

Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ROS, and interleukin-6 (IL-6) are involved in the tissue damage that occurs during IR because they are toxic molecules that alter cellular proteins, lipids and ribonucleic acids, leading to cellular dysfunction or death (21) In a model of ischemia and reperfusion. Yamane study in a lung transplant model in rats we examined the changes in gene expression levels in a rat lung transplant model using oligonucleotide microarrays and showed an increased in IL-6 (22).

IR activates different pathways of cell death, which can be categorized as necrosis, apoptosis or autophagy-associated cell death (23). We found an increased expression of cleaved caspase 3 in the IR group. Both of the PFC groups (PFC PRE-IR and PFC POST-IR), showed a lower expression of this protein, which was similar to the results of the SHAM group, suggesting cellular protection after reperfusion (24). The reduction of the expression of cleaved caspase 3 was also found in studies that evaluated the effect of vaporized PFC on pulmonary ischemia and reperfusion models, which demonstrates that our model of vaporized PFC has similar results with previous studies of our group that used the PFC in a liquid state. Our present model has some advantages from our previous model using instilled PFC, because vaporized PFC is an easily applicable method without the need for liquid instillation in the pulmonary system, proving to show the same benefits of liquid instillation in terms of less tissue damage and better organ viability (3, 12, 13).

Nitric Oxide (NO) plays an important role in vascular homeostasis and attenuates the capillary overflow and tissue damage in animal models of pulmonary IR (25). Nitric Oxide (NO) is produced via iNOS, which was originally identified in platelets and inflammatory cells such as neutrophils and macrophages. Yeh et al, 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



(26). Evidence suggests that increased lung apoptosis could be the mechanism which iNOS cause IR lung injury (27). In our study, the animals receiving PFC vaporized showed a significant reduction when compared to IR group, perhaps the PFC acts as an iNOS inhibitor, thereby reducing apoptosis caused by IR injury. Similar results were found in a study by Forgiarini et al using liquid PFC (3).

We observed an improvement in PaO<sub>2</sub> levels in PFC PFC POST-IR group compared to the SHAM group, this may be attributed to the fact that the perfluorocarbon has a protective role in the surfactant system and cellular membrane (28), furthermore it is known that PFC has a high oxygen and CO<sub>2</sub> diffusion capacity. Our results were similar to Forgiarini's et al that used liquid PFC for pulmonary preservation, in this setting we may suggest that vaporized PFC could preserve the same characteristics of the liquid PFC

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 (29). A reasonable explanation for this finding would be that oxidative stress resulting from ischemia may be different from that resulting from hypoxia (4).

In view of all the benefits demonstrated by the vaporized PFC, we can conclude that the vaporized PFC shown to have protective properties to the lung tissue, reducing the inflammatory response caused by IR injury. Thus, the vaporized PFC enhances their potential for the treatment of pulmonary ischemia-reperfusion injury, presenting similar characteristics to the liquid PFC. Furthermore, in its vaporized state, PFC is easily delivered to the entire lungs in a more uniform distribution and additionally it does not have the difficulties of ventilation of those lungs filled with liquid PFC. We suggest that vaporized PFC may be used as an adjuvant therapy for different lung injuries such as lung ischemia reperfusion after lung transplantation.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## References

1. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
2. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 1984;105:121-6.
3. Forgiarini LA, Jr., Forgiarini LF, da Rosa DP, Mariano R, Ulbrich JM, Andrade CF. Endobronchial perfluorocarbon administration decreases lung injury in an experimental model of ischemia and reperfusion. *J Surg Res*. 2013;183(2):835-40.
4. Andrade CF, Kaneda H, Der S, Tsang M, Lodyga M, Chimisso Dos Santos C, et al. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2006;25(11):1317-23.
5. Felix EA, Andrade CF, Cardoso PF, Thiesen GC, Antonio AC, Martins LK, et al. Ventilation strategy and its influence on the functional performance of lung grafts in an experimental model of single lung transplantation using non-heart-beating donors. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2010;36(5):554-61.
6. 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;279(3):L528-36.
7. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg*. 1991;161(4):488-503.
8. Forgiarini Junior LA, Holand AR, Forgiarini LF, da Rosa DP, Marroni NA, Cardoso PF, et al. Endobronchial perfluorocarbon reduces inflammatory activity before and after lung transplantation in an animal experimental model. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:193484.
9. 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. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2004;23(2):242-51.
10. Wang LS, Yoshikawa K, Miyoshi S, Nakamoto K, Hsieh CM, Yamazaki F, et al. The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a

simple ex vivo rabbit model used for functional assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989;98(3):333-42.

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

12. Hubler M, Souders JE, Shade ED, Polissar NL, Schimmel C, Hlastala MP. Effects of vaporized perfluorocarbon on pulmonary blood flow and ventilation/perfusion distribution in a model of acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology.* 2001;95(6):1414-21.

13. Wang X, Zhang J, Li X, Liu Y, Yang H, Zhao X, et al. Sustained improvement of gas exchange and lung mechanics by vaporized perfluorocarbon inhalation in piglet acute lung injury model. *The clinical respiratory journal.* 2014;8(2):160-6.

14. Forgiarini LA, Jr., Grun G, Kretzmann NA, de Munoz GA, de Almeida A, Forgiarini LF, et al. When is injury potentially reversible in a lung ischemia-reperfusion model? *J Surg Res.* 2013;179(1):168-74.

15. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol.* 1986;251(4 Pt 1):G567-74.

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

17. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry.* 1972;247(10):3170-5.

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

19. 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;76(9):4350-4.

20. Fujino Y, Goddon S, Chiche JD, Hromi J, Kacmarek RM. Partial liquid ventilation ventilates better than gas ventilation. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2000;162(2 Pt 1):650-7.

21. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):821-46.

22. Yamane M, Liu M, Kaneda H, Uhlig S, Waddell TK, Keshavjee S. Reperfusion-induced gene expression profiles in rat lung transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of*

Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2005;5(9):2160-9.

23. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med*. 2009;361(16):1570-83.

24. 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;57(5):309-11.

25. 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*. 2006;129(4):1024-30.

26. Rotta AT, Gunnarsson B, Hernan LJ, Fuhrman BP, Steinhorn DM. Partial liquid ventilation with perflubron attenuates in vivo oxidative damage to proteins and lipids. *Critical care medicine*. 2000;28(1):202-8.

27. Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:590987.

28. 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. *Critical care medicine*. 1996;24(6):1001-8.

29. 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. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2008;34(8):583-9.

## FIGURES

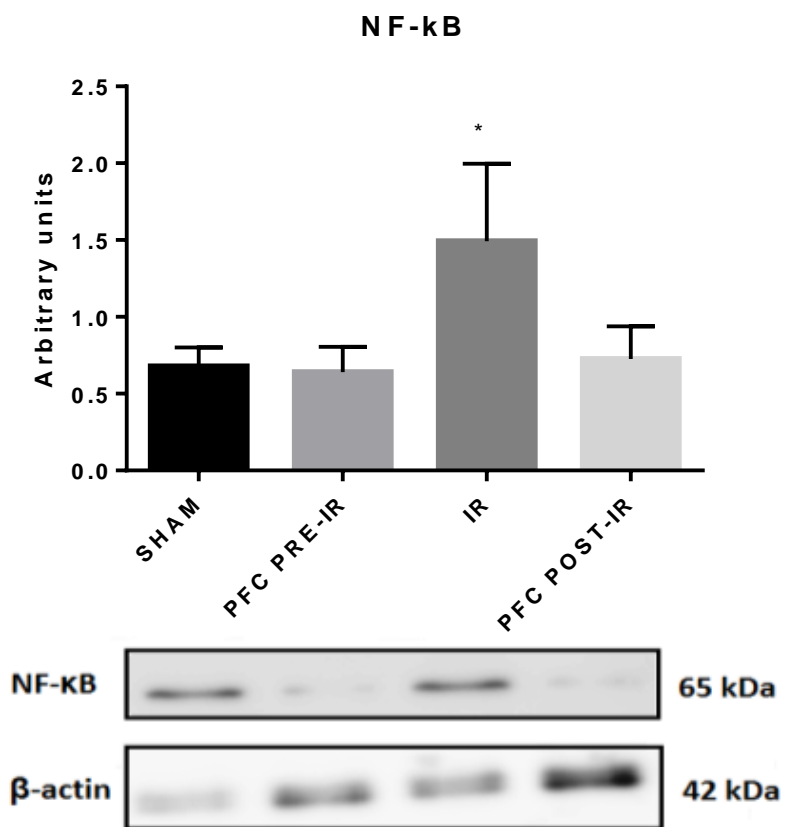


Figure 1 - Expression of NF-κB in lung tissue. Overexpression of NF-κB was found in the IR group (\*  $p < 0.05$ ). The images are representative samples of groups.

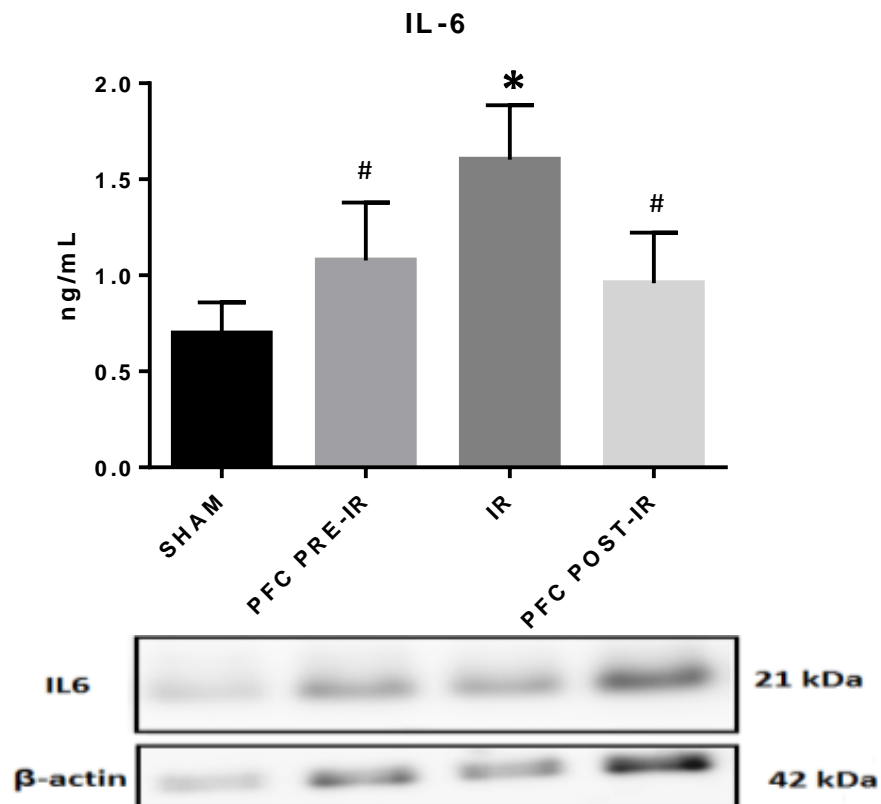


Figure 2 - Expression of IL-6 in lung tissue. Increase in the expression of IL-6 in lung tissue in the IR group when compared the group SHAM (\*  $p < 0.05$ ), and the groups PFC PRE-IR and PFC POST-IR the PFC attenuated the il-6 expression when compared to IR group (#  $p < 0.05$ ). The images are representative samples of groups.

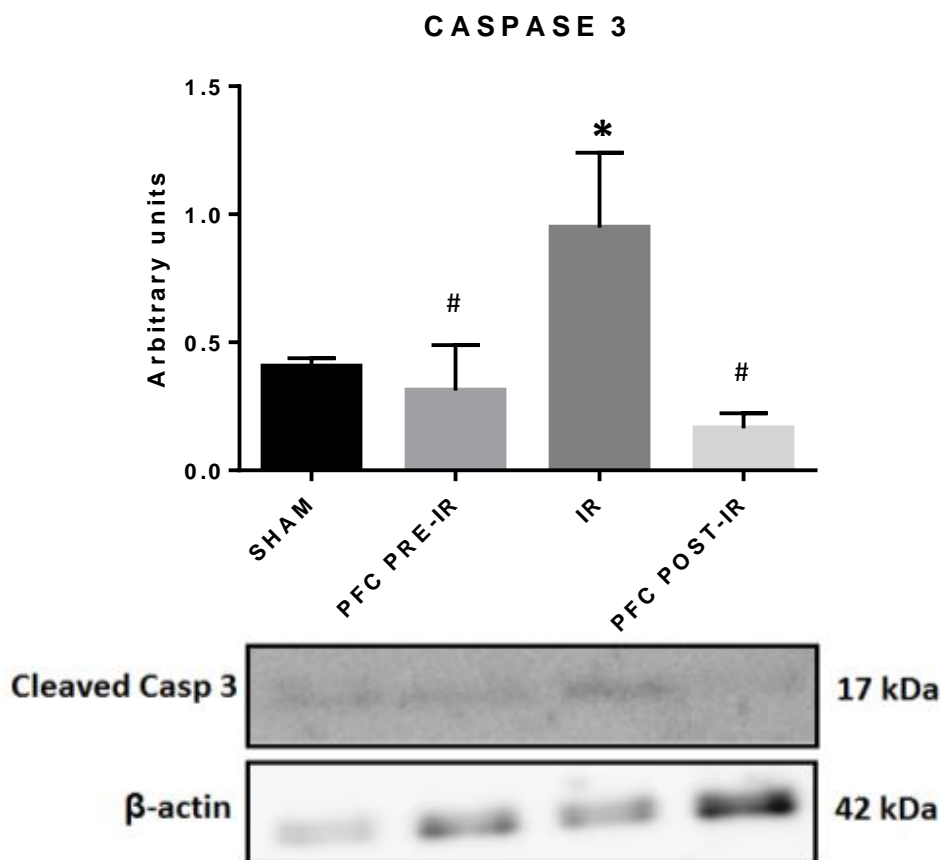


Figure 3: Expression of caspase 3 in lung tissue. Overexpression of caspase 3 was found in the IR group when compared the SHAM group (\*  $p < 0.05$ ), however in both PFC groups caspase 3 expression was attenuated when compared to IR group (#  $p < 0.05$ ). The images are representative samples of groups.



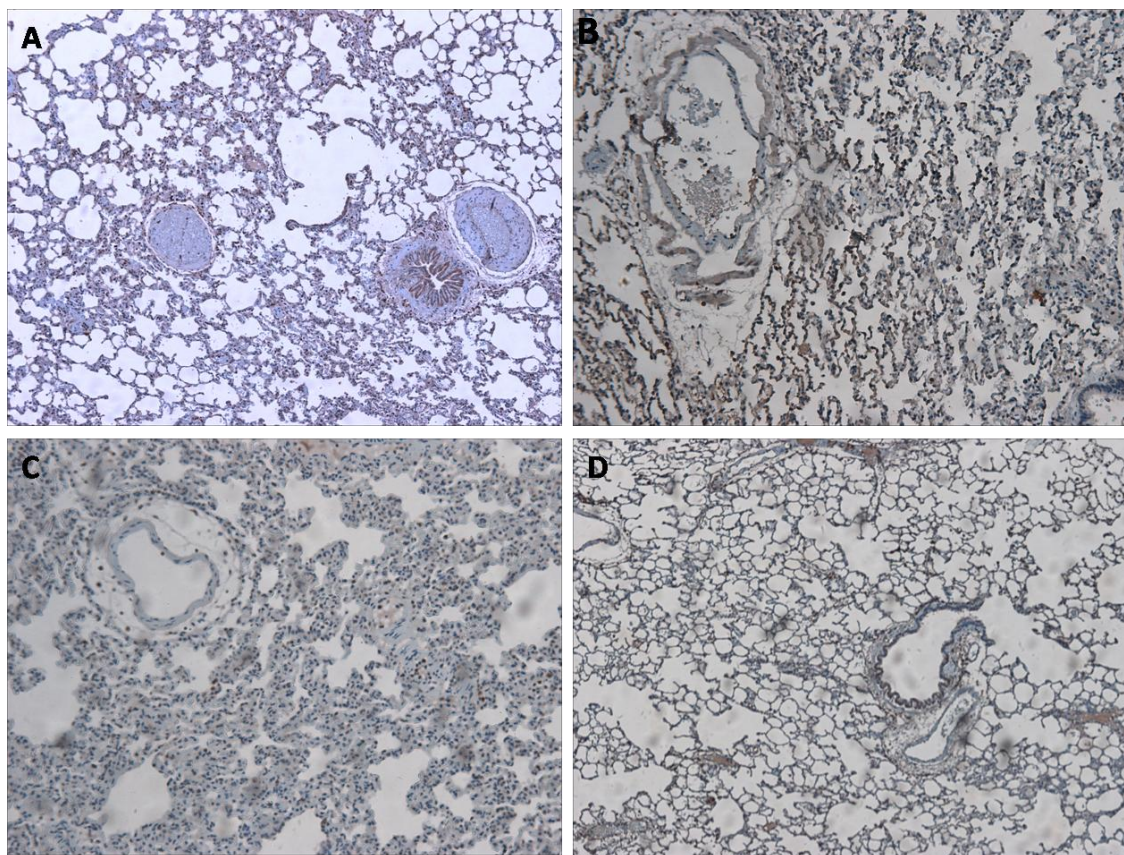


Figure 4: Expression of caspase 3 in lung tissue by the immunohistochemical technique. There was an increase in caspase 3 in IR group (C) when compared to other groups (A – SHAM; B – IR; C –PFC PRE-IR; D – PFC POST-IR). 20x

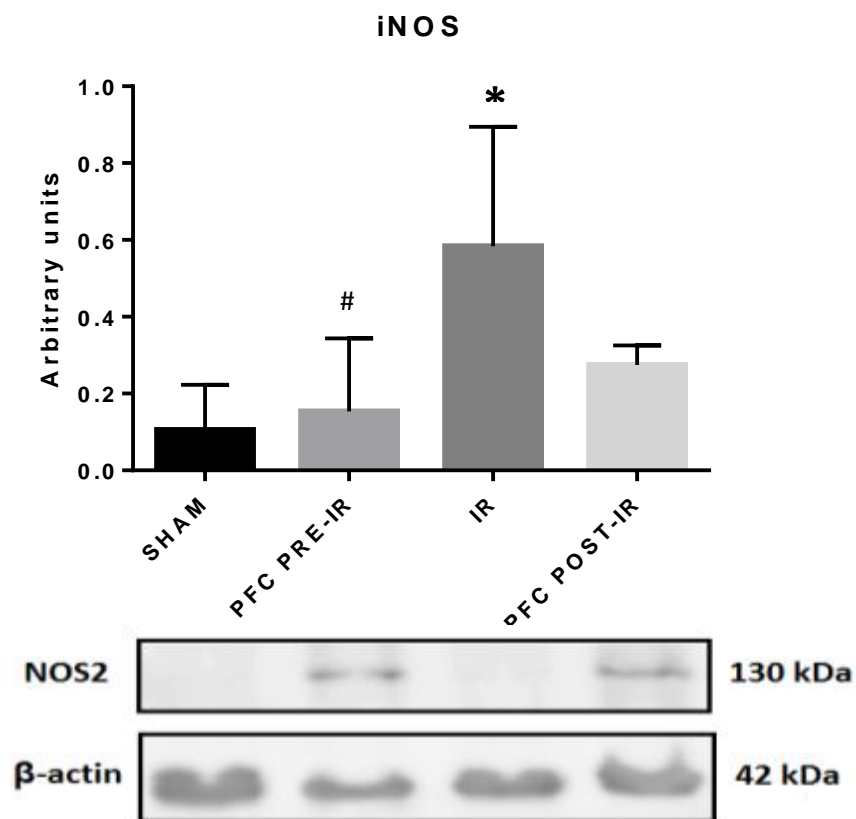


Figure 5: Expression of iNOS in lung tissue. Increased expression of iNOS in IR group when compared the group SHAM (\*  $p < 0.05$ ). PFC PRE-IR group attenuated iNOS expression when compared to IR group (#  $p < 0.05$ ). The images are representative samples of groups.

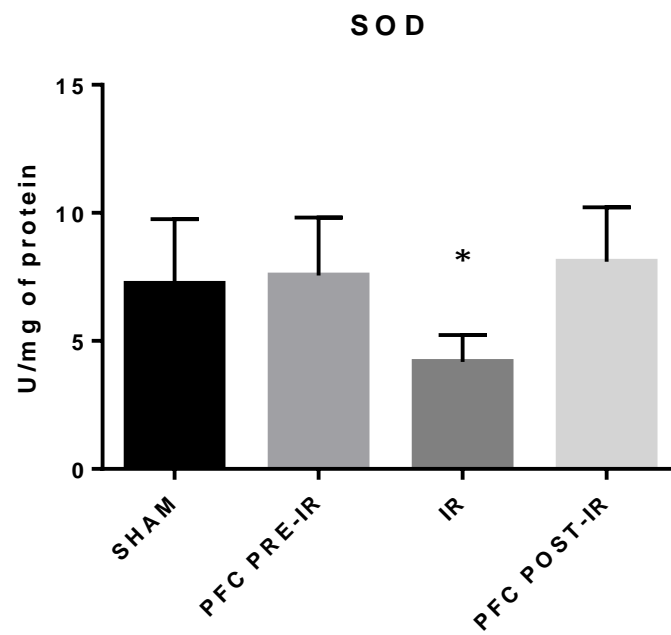


Figure 6: Expression of SOD in lung tissue. IR group had significantly lower values of SOD the others groups ( $p < 0.05$ ).

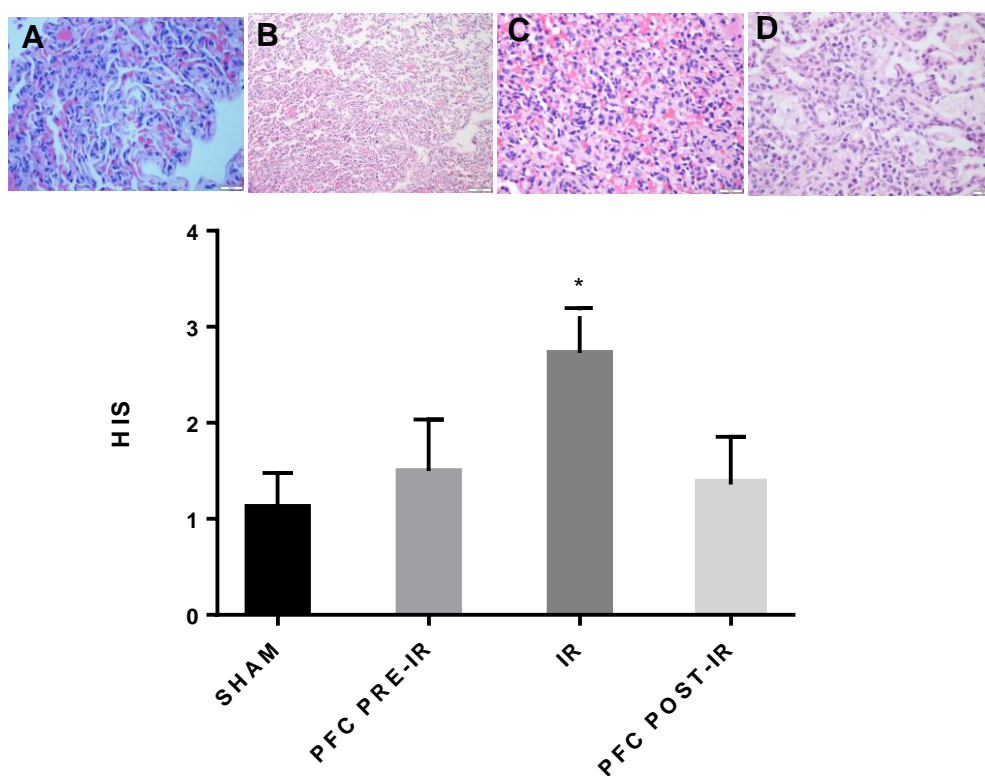


Figure 7 - Photomicrograph of the lung in different times of ischemia. The histological score (HIS) showed no significant difference between groups. HIS demonstrated significantly more lung injury in group IR ( $p < 0.05$ ). (A-Sham; B-PFC PRE-IR; C-IR; D-PFC POST-IR (x100 magnification)).

## 9. CONCLUSÃO

O Perfluorocarbono vaporizado atua como um fator adjuvante na proteção de pulmões de animais em diferentes modelos de lesão pulmonar

A administração de PFC vaporizado reduz a produção de radicais livres e provoca menos alterações estruturais pulmonares decorrentes do período de isquemia fria.

A administração do perfluorocarbono vaporizado é viável e de fácil aplicação em modelo de isquemia e reperfusão pulmonar reduzindo a resposta inflamatória e protegendo os pulmões do estresse oxidativo gerado durante este processo.

## 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para avaliar a eficiência do perfluorocarbono vaporizado na preservação pulmonar e na injúria de isquemia e reperfusão pulmonar utilizamos uma dose similar a utilizada por nosso grupo com o uso de perfluorocarbono líquido, utilizamos um equipamento de anestesia para vaporizar o PFC e associamos seu uso com a ventilação mecânica.

Após realizamos nosso primeiro estudo testando se o PFC vaporizado iria potencializar o efeito do baixo potássio dextran com a finalidade de melhorar a viabilidade do órgão. Em nosso segundo estudo, testamos o potencial do PFC vaporizado em um modelo de isquemia fria pulmonar. Podemos constatar que o PFC vaporizado pode ser utilizado como uma substância auxiliar na preservação de pulmões para transplante, mantendo a viabilidade celular e reduzindo o estresse oxidativo durante o período de isquemia fria.

Este trabalho forneceu importantes informações sobre a potencial utilização do perfluorocarbono vaporizado como uma terapia adjuvante para a preservação pulmonar, por ser um método de fácil aplicação e por apresentar diversos benefícios que se equivalem aos estudos realizados com PFC líquido.