

Marcus da Matta Abreu

O papel do azul de metileno na prevenção da lesão de isquemia-reperfusão em transplante pulmonar de ratos: estudo experimental

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de: Cirurgia Torácica e Cardiovascular
Orientador: Prof. Dr. Fabio Biscegli Jatene

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Abreu, Marcus da Matta

O papel do azul de metileno na prevenção da lesão de isquemia-reperfusão em transplante pulmonar de ratos : estudo experimental / Marcus da Matta Abreu. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Fábio Biscegli Jatene.

Descritores: 1.Transplante de pulmão 2.Isquemia 3.Reperfusão 4.Azul de metileno 5.Ratos Sprague-Dawley

USP/FM/DBD-166/13

*A Carlos Roberto, meu pai, e Ilza, minha mãe.
Por todo o carinho e amor, por todos os ensinamentos e incentivos.
Dedico meu sucesso a vocês amados pais.*

*À Kelli, minha amada esposa.
Por seu amor, companheirismo e compreensão.
Esta vitória também é sua.
Amo-te*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nunca removeu os obstáculos do meu caminho, mas sempre me deu forças para superá-los.

Aos meus pais, pela dedicação incondicional na minha formação, ensinando-me, sobretudo, a ter honra, caráter e dignidade. Obrigado pelo carinho e amor. Sem vocês, jamais chegaria até aqui. Amo vocês!

À minha querida esposa Kelli, por toda a paciência e compreensão durante minhas ausências e horas de trabalho. Por ser um exemplo de dedicação na docência, na assistência e na pesquisa. Por me incentivar a fazer tudo cada vez melhor. Por todo amor e carinho. Pelas revisões, conselhos, opiniões, por estar sempre ao meu lado. Certamente, meu porto seguro. Obrigado meu anjo. Te amo!

À minha família, sempre muito carinhosa e apostando em meu sucesso. Aos meus tios, primos e, em especial, às minhas queridas avós in memoriam.

Ao Professor Fabio Biscegli Jatene, por ter me recebido e aceitado me orientar neste trabalho. Grande exemplo de liderança e competência.

Ao Professor Paulo Manuel Pêgo-Fernandes, por seu papel fundamental na condução do laboratório, por sua disponibilidade e ajuda.

Aos biólogos e amigos Rogério Pazetti e Francine, por todo o apoio nas diversas etapas deste trabalho. Pelas orientações, conselhos e horas de trabalho árduo no laboratório. Este trabalho não seria possível sem vocês. Muito obrigado!

Às biólogas Rosângela, Karina, Natália e Liliane, por todo o apoio com as questões técnicas e logísticas. Por estarem sempre dispostas a ajudar. Natália, obrigado pela companhia nas disciplinas.

Ao biólogo Aristides, pela ajuda imprescindível com a análise estatística do trabalho.

À Professora Paulina, pelas orientações e sugestões.

Ao médico patologista Edwin, pela ajuda com as leituras de histopatologia e imunohistoquímica.

Aos professores Rodolfo e Ana Paula, pela colaboração com o trabalho.

À acadêmica de medicina e bolsista de iniciação científica Laís, pela ajuda com as leituras de lâminas.

Aos professores e hoje amigos. Jorge Montessi, por ter me incentivado a ser cirurgião torácico, professor e agora, doutor, muito obrigado. Edmílton Pereira de Almeida e João Paulo Vieira por todos os ensinamentos e amizade.

Aos amigos Juliana Dias e Vagner Campos, que se desdobraram para que minhas ausências fossem tranquilas. Obrigado pela amizade. É um prazer trabalhar com vocês.

Aos meus amigos que me incentivaram, apoiaram ou, simplesmente, confiaram.

Às funcionárias do laboratório Anatomo-Cirúrgico (Eliana e Márcia) e da pós-graduação (Neuza, Juliana e Eva) por estarem sempre dispostas a ajudar.

Às funcionárias Sandra e Esmeralda, do laboratório de imunohistoquímica, pelo carinho no preparo das lâminas.

Agradeço à Fapesp, pela ajuda financeira, sem a qual este trabalho não seria possível.

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."
Bertolt Brecht*

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."
Martin Luther King*

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

Referências: adaptada de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses, e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Fisiopatologia da lesão de isquemia reperfusão	5
1.2 Azul de metileno	7
1.2.1 O papel do azul de metileno como agente antioxidante	8
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3 MÉTODOS	13
3.1 Animais e grupos.....	14
3.2 Procedimento cirúrgico.....	16
3.2.1 Animais doadores.....	16
3.2.2 Animal receptor	21
3.2.2.1 <i>Pneumonectomia e implante do enxerto</i>	<i>21</i>
3.2.2.2 <i>Eutanásia dos animais e coleta de amostras</i>	<i>23</i>
3.3 Análise gasométrica – medida da PaO₂.....	25
3.4 Dosagem do óxido nítrico exalado (NOex).....	25
3.5 Coleta e análise do lavado broncoalveolar – citologia.....	26
3.6 Análise bioquímica – dosagem do ácido úrico	27
3.7 Análise histopatológica – microscopia óptica	28

3.8 Ensaio imunoenzimático – citocinas	29
3.9 Imunohistoquímica.....	30
3.10 Análise estatística.....	33
3.10.1 Análise estatística descritiva	33
3.10.2 Análise estatística inferencial	33
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Análise gasométrica – PaO₂	35
4.2 Dosagem do óxido nítrico exalado.....	37
4.2.1 Dosagem do óxido nítrico exalado inicial	37
4.2.2 Dosagem do óxido nítrico exalado final.....	37
4.3 Análise do lavado broncoalveolar	38
4.3.1 Citologia	38
4.3.1.1 Contagem celular total.....	38
4.3.1.2 Citologia – contagem de neutrófilos.....	39
4.3 Análise bioquímica – dosagem do ácido úrico	40
4.5 Análise histopatológica – microscopia óptica	41
4.5.1 Análise histopatológica – neutrófilos	41
4.5.1.1 Perivascular	41
4.5.1.2 Perialveolar.....	42
4.5.2 Análise histopatológica – edema.....	43
4.5.2.1 Perivascular	43
4.5.2.2 Perialveolar.....	44
4.5.3 Análise histopatológica – hemorragia.....	45
4.6 Citocinas.....	46
4.6.1 TNF- α	46
4.6.1 IL-6.....	47
4.6.2 Cinc-1.....	48

4.7 Imunohistquímica	49
4.7.1 Caspase 3	49
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÕES	65
7 ANEXOS	67
8 REFERÊNCIAS.....	69

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mecanismo molecular da lesão de IR.	7
Figura 2 –	Ventilador mecânico de roedores.....	16
Figura 3 –	Laparotomia mediana e exposição da veia cava inferior para heparinização do animal	17
Figura 4 –	Exposição do bloco cardiopulmonar obtida por meio de esternotomia mediana.....	18
Figura 5 –	Abertura do ventrículo direito e perfusão pulmonar anterógrada com solução LPD.....	19
Figura 6 –	Bloco cardiopulmonar retirado do animal doador e mantido em insuflação por meio de oclusão traqueal	20
Figura 7 –	Microscópio óptico utilizado para a dissecação do hilo pulmonar e implante dos enxertos	22
Figura 8 –	Anastomose dos elementos do hilo pulmonar realizada pela técnica dos cuffs com auxílio do microscópio óptico (aumento de 16X)	22
Figura 9 –	Enxerto pulmonar insuflado após anastomose brônquica.....	23
Figura 10 –	Laparotomia mediana e exposição da cavidade peritoneal para coleta de sangue arterial e venoso em animal do grupo AM.....	24
Figura 11 –	Animal em ventilação mecânica sendo submetido a coleta do NOex.....	26
Figura 12 –	Contagem diferencial celular no lavado broncoalveolar	27
Figura 13 –	Análise histopatológica pela técnica do <i>point counting</i> , utilizando retículo de Weibel	29
Figura 14 –	Avaliação da apoptose por quantificação da caspase 3 pelo método de imunohistoquímica	32
Figura 15 –	Quantificação da PaO ₂ por gasometria arterial	35
Figura 16 –	Quantificação da PaO ₂ por gasometria arterial	36
Figura 17 –	Dosagem do NOex inicial.....	37
Figura 18 –	Dosagem do NOex final	38

Figura 19 – Contagem total de células no lavado broncoalveolar	39
Figura 20 – Contagem de neutrófilos no lavado broncoalveolar	40
Figura 21 – Dosagem do ácido úrico venoso	41
Figura 22 – Contagem de neutrófilos no tecido perivascular em lâminas coradas por hematoxilina e eosina.....	42
Figura 23 – Contagem de neutrófilos no tecido perialveolar em lâminas coradas por hematoxilina e eosina.....	43
Figura 24 – Quantificação do edema no tecido perivascular em lâminas coradas por hematoxilina e eosina.....	44
Figura 25 – Quantificação do edema no tecido perialveolar em lâminas coradas por hematoxilina e eosina.....	45
Figura 26 – Quantificação da hemorragia intra-alveolar em lâminas coradas por hematoxilina e eosina.....	46
Figura 27 – Quantificação do TNF- α no lavado broncoalveolar	47
Figura 28 – Quantificação da IL-6 no lavado broncoalveolar	48
Figura 29 – Quantificação do Cinc-1 no lavado broncoalveolar	49
Figura 30 – Quantificação da Caspase 3 por imunohistoquímica	50

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AM	Azul de metileno
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
cGMP	Guanosinamonofosfatociclase
CINC-1	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant
DAB: 3-3'	Diaminobenzamidina
DP	Desvio padrão
DPE	Disfunção primária do enxerto
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IL-6	Interleucina 6
IQ	Intervalo interquartil
IR	Isquemia reperfusão
LBA	Lavado broncoalveolar
LIM 11	Laboratório de pesquisa em cirurgia cardiovascular e fisiologia da circulação
LIM 61	Laboratório de pesquisa em cirurgia torácica
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NO	Óxido nítrico
NOex	Óxido nítrico exalado
PaO ₂	Pressão arterial de oxigênio
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline contendo Tween 20
Pg	Picograma
PGE1	Prostaglandina E1

PPB	Partículas por bilhão
SPSS	Statistical package for the social sciences
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VS	Versus (contra)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
<	Menor que
=	Igual
±	Mais ou menos
®	Produto registrado
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
G	Gauge
h	Hora
mL	Mililitro
nM	Nanômetro
°C	Graus centígrados

RESUMO

Abreu MM. *O papel do azul de metileno na prevenção da lesão de isquemia-reperfusão em transplante pulmonar de ratos: estudo experimental*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 80p.

Introdução: O transplante de pulmão é uma opção terapêutica bem estabelecida para o tratamento de pneumopatias em estágio final. Uma complicação frequente relacionada aos transplantes é a lesão de isquemia e reperfusão (IR), estando o estresse oxidativo envolvido no processo. O azul de metileno (AM) é um inibidor da produção de espécies reativas de oxigênio, atuando como receptor alternativo de elétrons da xantina oxidase. **Objetivo:** Avaliar a eficácia do AM como inibidor da lesão de IR em transplante pulmonar de ratos. **Métodos:** Quarenta ratos fêmea Sprague Dawley (300g – 350g) foram divididas em quatro grupos de dez animais. Os animais foram submetidos a transplante pulmonar unilateral esquerdo. Os enxertos foram expostos a 3 ou 6 horas de isquemia fria seguido de 2 horas de reperfusão. Nos animais do grupo controle, 2 mL de solução salina foram injetados na cavidade peritoneal e, nos animais do grupo experimento, 2 mL de AM a 1% foram injetados da mesma forma. **Resultados:** A dosagem da PaO₂ foi significativamente superior no grupo AM entre os animais submetidos a isquemia de 3 horas (AM = 150,2 ± 50,1 vs Salina = 102,6 ± 40,4 mmHg; p = 0,028), assim como a dosagem do óxido nítrico exalado foi significativamente inferior no mesmo grupo (AM = 3,2 ± 2,0 vs Salina = 5,2 ± 2,3 ppb; p = 0,05). O infiltrado neutrofílico foi menor nos animais do grupo AM submetidos a 6 horas de isquemia no lavado broncoalveolar (LBA); (AM = 11,8 ± 7,4 vs Salina = 30 ± 19,2 X 10⁴/mL; p = 0,023). A análise histopatológica mostrou menor formação de edema perivascular no grupo AM submetido a 6 horas de isquemia (AM = 35,2 ± 7,65 vs Salina = 44,8 ± 6,39%; p = 0,001) e perialveolar no grupo AM submetido a 3 horas de isquemia (AM = 18,4 ± 14,2 vs Salina = 28,1 ± 18,2%; p = 0,041) e menor infiltrado neutrofílico perialveolar na comparação entre os grupos submetidos a 6 horas de isquemia (AM = 2,8 ± 2,2 vs Salina = 5,1 ± 3,1%; p = 0,046). Os níveis de IL-6 no LBA foram inferiores no grupo AM em ambos os tempos de isquemia (3 h – AM = 122,4 ± 24,9 vs Salina = 175,6 ± 50,3 pg/mL; p = 0,008; 6 h – AM = 142 ± 38,7 vs Salina = 351,3 ± 80,7 pg/mL; p = 0,002); Os níveis de TNF-α foram menores no grupo AM submetido a 6 horas de isquemia (AM = 189,5 ± 93,3 vs Salina = 342,9 ± 130,4 pg/mL, p = 0,007). A dosagem do ácido úrico foi significativamente maior no grupo AM em ambos os tempos de isquemia (3 h – AM = 4,7 ± 0,9 vs Salina = 2,7 ± 0,7 mg/dL; p = 0,003; 6 h – AM = 5,3 ± 2,4 vs Salina = 2,3 ± 0,9 mg/dL; p < 0,001). Não houve diferença entre os grupos em relação a apoptose. **Conclusão:** O AM demonstrou ser uma droga eficaz na prevenção da lesão de isquemia e reperfusão no transplante pulmonar de ratos.

Descritores: Transplante de pulmão; Isquemia; Reperfusão; Azul de metileno; Ratos Sprague Dawley

ABSTRACT

Abreu MM. *The role of methylene blue in the prevention of ischemia-reperfusion injury in rat lung transplantation: an experimental study* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013. 80p.

Introduction: Lung transplantation (LTx) has become an established therapeutic option for end-stage pulmonary disease. Ischemia reperfusion injury (IR) is a major cause of organ dysfunction after LTx and oxidative stress is involved in this process. Methylene blue (MB) is an inhibitor of reactive oxygen species production. **Objective:** To investigate the effects of MB on the IR in a rodent model of LTx. **Methods:** Forty female Sprague Dawley rats (300g – 350g) were divided into four groups (n = 10) according to treatment (saline solution or MB) and graft cold ischemic time (3 or 6 hours). Animals underwent a left-sided unilateral lung transplantation. Recipients received 2mL of intraperitoneal saline or MB 1%. After 2 hours of reperfusion, animals were killed and blood gas, exhaled nitric oxide, cell count and cytokines levels in bronchoalveolar lavage (BAL) as well as histopathology, serum uric acid and apoptosis were evaluated. **Results:** PaO₂ was significantly higher in MB group undergoing 3 hour ischemic time (MB = 150.2 ± 50.1 vs Saline = 102.6 ± 40.4 mmHg; p = 0.028). Exhaled nitric oxide values showed differences only between groups with 3 hour of ischemia (MB = 3.2 ± 2.0 vs Saline = 5.2 ± 2.3 ppb; p = 0.05). Neutrophils in BAL were different between groups subjected to 6 hours of ischemia (MB = 11.8 ± 7.4 vs Saline = 30.0 ± 19.2 × 10⁴/mL; p = 0.023). IL-6 levels in BAL were lower in MB group in both ischemic time (3 h – MB = 122.4 ± 24.9 vs Saline = 175.6 ± 50.3 pg/mL; p = 0.008; 6 h – MB = 142 ± 38.7 vs Saline = 351.3 ± 80.7 pg/mL; p = 0.002); TNF-α levels were also lower in MB group undergoing 6 hour of ischemia (MB = 189.5 ± 93.3 vs Saline = 342.9 ± 130.4 pg/mL; p = 0.007). The number of neutrophils in lung parenchyma were reduced in MB group (6 h – MB = 2.8 ± 2.2 vs Saline = 5.1 ± 3.1%; p = 0.046) and also decreased edema in perivascular (6 h – MB = 35.2 ± 7.65 vs Saline = 44.8 ± 6.39%, p = 0.001) and perialveolar tissues (3 h – MB = 18.4 ± 14.2 vs Saline = 28.1 ± 18.2% p = 0.041) were observed. Uric acid levels were higher in MB group in both ischemic time (3 h – MB = 4.7 ± 0.9 vs Saline = 2.7 ± 0.7 mg/dL; p = 0.003; 6 h – MB = 5.3 ± 2.4 vs Saline = 2.3 ± 0.9 mg/dL; p < 0.001). There were no difference in the expression of apoptosis. **Conclusion:** MB was able to prevent ischemia-reperfusion injury in this lung transplantation model and represent a new option for further studies.

Descriptores: Lung transplantation; Ischemia; Reperfusion; Methylene Blue; Sprague Dawley Rats.

1 INTRODUÇÃO

O primeiro transplante pulmonar em seres humanos foi realizado nos Estados Unidos da América, na Universidade do Mississippi, em 1963, em um paciente portador de carcinoma de pulmão, que acabou evoluindo ao óbito após 18 dias. Após 20 anos, o grupo de transplante de pulmão de Toronto, Canadá, realizou a primeira cirurgia com sucesso. No Brasil, o primeiro transplante pulmonar foi realizado no ano de 1989¹ na cidade de Porto Alegre.

Atualmente, o transplante pulmonar é uma opção terapêutica bem estabelecida para o tratamento de diversas doenças. No Brasil, o número de transplantes vem crescendo a cada ano, assim como a qualidade dos resultados².

Qualquer paciente de 65 anos ou menos, portador de uma pneumopatia terminal não neoplásica, com condição ambulatorial preservada, sem outras comorbidades, com perfil psicossocial adequado, e sem outras alternativas terapêuticas, é considerado candidato potencial ao transplante³.

As principais condições que levam os pacientes ao transplante pulmonar são a doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose cística, fibrose pulmonar idiopática, bronquiectasia, hipertensão pulmonar primária e síndrome de Eisenmenger³. São causas menos comuns de transplantes pulmonares a linfangioleiomiomatose, sarcoidose, silicose, entre outras³.

De acordo com dados fornecidos pelo Registro Brasileiro de Transplantes da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos, no ano de 2011 foram realizados 49 transplantes pulmonares no Brasil, e a sobrevida dos pacientes transplantados no primeiro ano é de 67%⁴.

Uma série de fatores como os episódios de rejeição, as infecções, as complicações da anastomose brônquica⁵ e a dificuldade no tratamento do paciente no período pós-operatório imediato tornam o transplante pulmonar um verdadeiro desafio⁶.

Um obstáculo ao sucesso dos transplantes pulmonares é a lesão de isquemia e reperfusão (IR) que, em sua forma clínica grave, é também conhecida como disfunção primária do enxerto (DPE), estando associada à

elevada morbimortalidade nos primeiros dias após o transplante e, a médio e longo prazo, ao desenvolvimento de bronquiólite obliterante, como forma de rejeição crônica. Sua ocorrência está relacionada a fatores que envolvem o doador, o receptor e o ato cirúrgico propriamente dito¹.

Alguns eventos estão associados ao risco elevado do desenvolvimento da lesão de IR, como a necessidade de circulação extracorpórea no intra-operatório, o uso de hemoderivados, o tempo de isquemia dos enxertos superior a 6 horas e a utilização de pulmões de doadores considerados não ideais. As soluções de preservação pulmonar com elevado conteúdo de potássio também estão relacionadas na gênese da lesão de IR⁷.

Diversas estratégias têm sido adotadas para minimizar os efeitos da lesão de IR sobre os pulmões transplantados, com destaque para o condicionamento ex-vivo dos enxertos a serem implantados, a utilização de soluções de preservação com baixo conteúdo de potássio e o uso de drogas tanto em caráter clínico quanto experimental^{7,8,9,10}.

No passado, acreditava-se que os pulmões seriam órgãos relativamente protegidos contra o processo de isquemia devido a sua dupla circulação e a disponibilidade de oxigênio proveniente da ventilação alveolar. Atualmente, sabe-se que qualquer forma de interrupção na chegada de oxigênio aos pulmões é suficiente para levar a repercussões clínicas significativas¹¹.

A fisiopatologia da formação da lesão de IR é resultado de uma série de eventos mediados por diversos fatores, como a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) – especialmente os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio –, pela interação de macrófagos do doador com leucócitos do receptor, a agregação plaquetária, a ativação neutrofílica e a peroxidação lipídica, as quais levam ao aumento da permeabilidade endotelial na microcirculação pulmonar, com extravasamento de fluidos e consequente edema intersticial e alveolar^{1,12}.

A lesão de IR, quando extensa, pode levar à DPE, que ocorre em 15 a 20% dos casos^{13,14}. Clinicamente, esta entidade é reconhecida quando a relação PaO_2/FiO_2 (pressão arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio) é inferior a 200 mmHg nas primeiras 72 horas após o implante do enxerto⁷.

Nos doadores cadavéricos, ocorre uma série de alterações que acarretam na interrupção da homeostase e funções endócrinas que, conseqüentemente, podem possibilitar uma intensa cascata inflamatória, com a liberação de interleucinas e outros agentes que reduzem a tolerância dos órgãos à isquemia fria⁹.

Um conceito que pode melhorar as perspectivas futuras dos resultados dos transplantes pulmonares é o condicionamento “ex-vivo” dos enxertos. Trata-se do manuseio do enxerto em circuito isolado, o qual possui condições ótimas para a reperusão do órgão com uma solução especial normotérmica, permitindo a manutenção do metabolismo celular e possibilitando o preparo e utilização de órgãos que seriam rejeitados⁷.

Ainda com o objetivo de diminuir os efeitos da lesão de IR, nossa atenção tem sido dirigida à solução de preservação de órgãos. Inicialmente, esta conservação era feita por meio de soluções salinas balanceadas e soluções de Ringer-lactato. A solução de preservação deve ser capaz de diminuir o edema celular induzido pela hipotermia, prevenir a acidose intracelular, evitar a produção de ERO e oferecer substratos para a regeneração dos componentes fosfatados de alta energia durante a fase de reperusão¹.

A utilização de soluções extracelulares de dextran com baixa concentração de potássio parece ser mais adequada para a preservação pulmonar, tendo o potencial efeito de diminuir a lesão de IR por causar menor agressão às células endoteliais e menor grau de vasoconstrição, podendo levar a diminuição na produção de agentes oxidantes e vasoconstritores¹.

Drogas como a prostaglandina-E1 (PGE1) são rotineiramente utilizadas no ato operatório de transplantes pulmonares, com o intuito de diminuir a incidência de DPE, graças a seu potente efeito vasodilatador pulmonar, principalmente quando soluções com elevadas concentrações de potássio são empregadas. Outro grupo de drogas que são utilizadas com a finalidade de prevenir os efeitos deletérios da lesão de IR é o dos corticóides¹. Por outro lado, ainda hoje, esta droga é considerada como um dos principais fatores relacionados ao insucesso do transplante pulmonar principalmente devido às complicações da anastomose brônquica⁶.

Diferentes drogas têm sido utilizadas em caráter clínico e experimental na tentativa de bloqueio das vias que levam à formação das substâncias que causam a lesão de IR no transplante pulmonar. Neste sentido, o sildenafil, o ebselen e o alopurinol mostraram benefício na diminuição da lesão de IR em modelos animais^{14,15,16}. Outro estudo demonstrou benefício com o uso da aprotinina aplicada em transplantes em humanos⁹.

Acreditamos que novos estudos neste sentido ainda são necessários para que se encontre drogas capazes de reduzir significativamente a lesão de IR no transplante pulmonar, levando, desta forma, à diminuição das complicações relacionadas à rejeição aguda e crônica, e melhorando a sobrevida global que hoje é em torno de 80% no primeiro ano e 50% em cinco anos⁶.

1.1 Fisiopatologia da lesão de isquemia reperfusão

A lesão de IR é uma situação que envolve complexas alterações celulares, moleculares e bioquímicas. Simultaneamente, diversos mecanismos contribuem para a formação das alterações morfofuncionais que são caracterizadas por aumento da resistência vascular pulmonar, aumento da permeabilidade capilar pulmonar e edema, levando a prejuízo na troca gasosa com uma elevação no gradiente alvéolo-arterial de oxigênio e queda na PaO_2 .

A resposta morfológica do endotélio é caracterizada pela presença de apoptose e infiltração por macrófagos e polimorfonucleares. A hipóxia leva a expressão elevada de moléculas de adesão celular e a produção de ERO levando a uma ativação das células endoteliais microvasculares que se tornam ainda mais disfuncionais¹¹. Paralelamente, o surfactante pulmonar sofre alterações em sua composição, função e metabolismo, levando a uma diminuição na complacência pulmonar. O pré-tratamento com surfactante pulmonar em modelos de transplante experimental já foi testado com sucesso na diminuição, a longo prazo, das lesões causadas pela IR¹⁷.

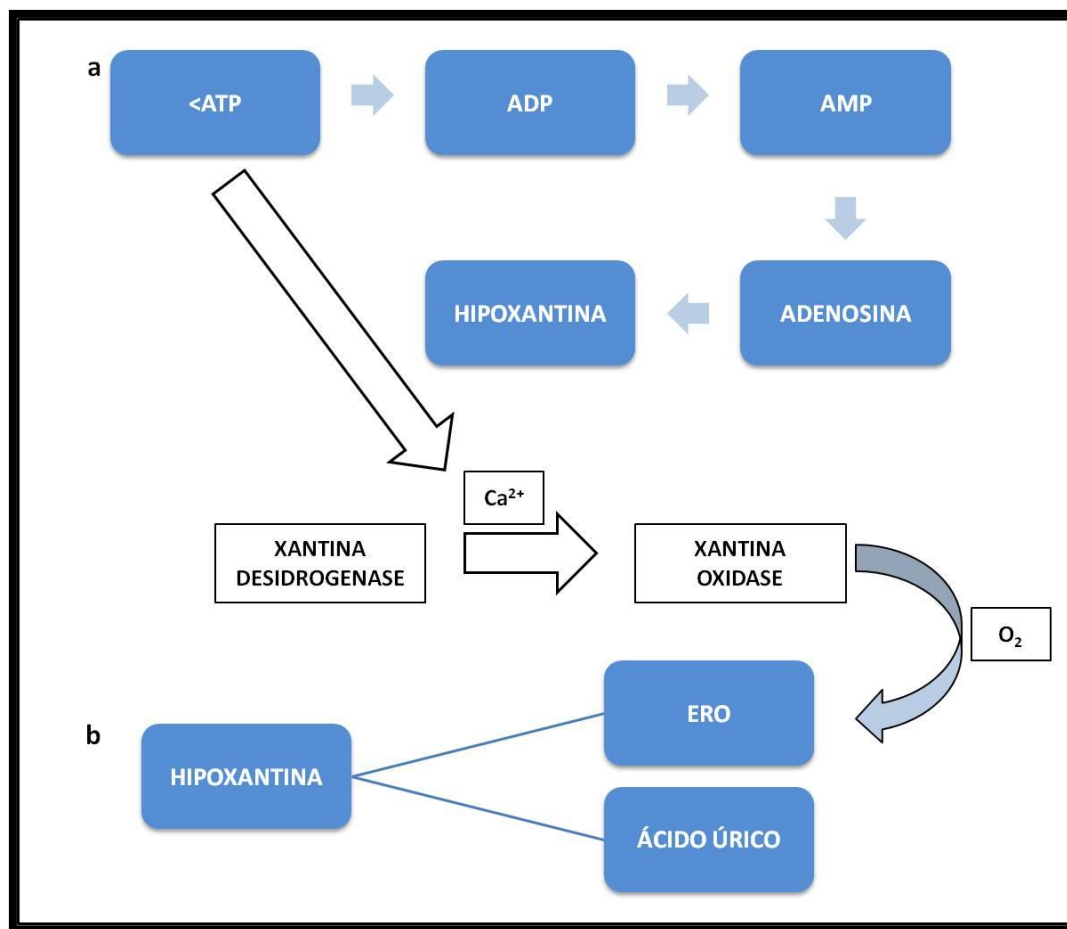
A isquemia tecidual é resultante da diminuição na oferta de oxigênio para as células, o que causa diminuição na síntese e ressíntese de adenosina

trifosfato (ATP) e, conseqüentemente, na energia disponível ao metabolismo celular. Isso cria um gradiente iônico na membrana celular devido à diminuição no transporte ativo do cálcio para o exterior da célula. O acúmulo do cálcio citoplasmático leva à ativação de uma protease que converte a xantina desidrogenase em xantina oxidase.

Concomitante a estes eventos, ocorre acúmulo de adenosina monofosfato (AMP), que sofre degradação em substâncias como a adenosina, inosina e hipoxantina. Durante a reperfusão, na presença de oxigênio, a enzima xantina oxidase transforma a hipoxantina em ERO como os radicais superóxido, peróxido e hidroxila^{11,12}. Sem a ação da xantina oxidase, a hipoxantina seria degradada em ácido úrico¹¹.

As ERO levam a ativação dos macrófagos alveolares que estimulam a produção de citocinas proinflamatórias e podem reagir com o óxido nítrico levando a formação de radicais altamente tóxicos, doravante denominados espécies reativas de nitrogênio¹¹.

A produção pulmonar de ERO ocorre simultaneamente em diversas vias: mitocôndrias, ativação da enzima xantina oxidase, pelo sistema do NADPH oxidase, pela via da óxido nítrico sintase e neutrófilos, sendo que, no contexto do transplante pulmonar, a via do NADPH oxidase é menos importante, pois ela acontece nos casos onde não há perfusão, mas a ventilação é mantida¹¹. A Figura 1 representa os mecanismos moleculares da IR.



FONTE: den Hengsy, 2010¹¹

Figura 1 – Mecanismo molecular da lesão de IR. a: fase isquêmica; b: reperfusão (ATP: adenosina trifosfato, ADP: adenosina difosfato, AMP: adenosina monofosfato, Ca^{2+} : cálcio, O_2 : oxigênio, ERO: espécies reativas de oxigênio)

1.2 Azul de metileno

O azul de metileno (AM) é um composto aromático, heterocíclico, sólido, verde escuro, solúvel em água, produzindo solução azul, inodoro, com fórmula molecular $C_{16}H_{18}ClN_3S$ e massa molar de 319.85 g/mol, tendo muitas aplicações nos mais variados campos, como medicina, biologia e química¹⁸.

Trata-se de uma droga que possui absorção oral variando em torno de 53 a 97%, e é metabolizado em leucometileno azul, que é eliminado pela bile, fezes e urina¹⁸. Os efeitos adversos descritos no uso em seres humanos foram

arritmias cardíacas, vasoconstrição coronariana, diminuição do débito cardíaco, do fluxo sanguíneo renal e mesentérico, aumento na pressão arterial pulmonar¹⁸ e anafilaxia¹⁹. Porém, só existe contra-indicação em casos de insuficiência renal grave e hipersensibilidade a substância¹⁸.

O AM possui interação medicamentosa com a dapsona, a qual pode ter seu efeito indutor de anemia hemolítica aumentado devido à formação de metabólitos reativos, como a hidroxilamina, a qual oxida a hemoglobina¹⁸. Por ser um inibidor da enzima monoamino-oxidase, pode interagir com drogas da mesma classe ou com inibidores seletivos da recaptação de serotonina, levando a toxicidade por esta substância²⁰.

O AM tem sido usado como droga terapêutica há mais de um século, principalmente para o tratamento da metahemoglobinemia, como antídoto do cianato, corante bacteriológico e para a localização de fístulas¹². A sua utilização para o tratamento da síndrome vasoplégica em diversas situações clínicas como o pós-operatório de cirurgias cardíacas, especialmente com a utilização de circulação extracorpórea e na sepse já foi amplamente estudada^{18,19,21,22}. O AM já foi utilizado também para o tratamento da síndrome hepatopulmonar, malária, priapismo, neutralização dos efeitos da heparina e tratamento da neurotoxicidade causada pela ifosfamida²⁰.

Algumas aplicações clínicas vêm sendo alvo de estudos com a possibilidade de efeitos benéficos do AM no tratamento da doença de Alzheimer, ação antibacteriana quando aplicado em terapia fotodinâmica, agindo contra bactérias metilino resistentes e como terapêutica oncológica por potencial efeito indutor de apoptose de células malignas²⁰. Um estudo experimental demonstrou proteção cerebral em animais submetidos à parada cardiorrespiratória²³.

1.2.1 O papel do azul de metileno como agente antioxidante

Atualmente, diversos estudos experimentais e clínicos buscam utilizar as propriedades antioxidantes do AM, e sua ação inibitória contra o óxido nítrico.

O mesmo já foi utilizado para o tratamento da síndrome de resposta inflamatória sistêmica no pós-operatório de cirurgia torácica de grande porte²⁴, no tratamento das alterações hemodinâmicas após lesão de IR em transplante hepático²⁵ e no tratamento da síndrome vasoplégica pós cirurgia cardiovascular com o uso de circulação extracorpórea^{18,22}.

Diversos modos de ação têm sido descritos para o AM. Diferentes mecanismos predominam nas diversas situações clínicas. Duas ações do AM merecem destaque na fisiopatologia da lesão de IR.

Primeiramente, a atividade do AM no processo de IR se baseia na supressão da produção de ERO, por atuar como receptor alternativo de elétrons da xantina oxidase, competindo com o oxigênio molecular pela transferência destes¹². Os elétrons são transferidos ao AM a partir do centro ferro-enxofre da xantina oxidase, impedindo a conversão do oxigênio molecular em superóxido¹².

Outro mecanismo de ação relacionado ao AM e ao processo de IR é a ação inibitória da droga sobre o óxido nítrico. O óxido nítrico é um potente vasodilatador e o seu papel no transplante pulmonar com potencial efeito protetor contra as lesões de IR tem sido descrito por alguns autores^{26,27,28}.

Trata-se de uma ERO sintetizada a partir do aminoácido L-arginina. Esta reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase. Em pequenas concentrações, age como neurotransmissor e vasodilatador através da síntese da guanosinamonofosfatociclase (cGMP) a partir da ativação da enzima guanilato ciclase²⁰.

Diversas isoformas de óxido nítrico são encontradas. A constitutiva está presente nas células endoteliais e nos neurônios, já a isoforma indutível é expressa mediante a ação de citocinas, endotoxinas e outros mediadores inflamatórios²⁰.

Quando em elevadas concentrações e, especialmente na presença dos radicais superóxido, a isoforma indutível do NO pode dar origem ao radical peroxinitrito e ao ácido peroxinitroso, os quais podem dissociar-se em dióxido de nitrogênio, radical hidroxila e NO_2^+ . Estes radicais participam de processos de peroxidação lipídica e aumento da adesão celular endotelial. Nos pulmões,

o óxido nítrico pode levar a formação do tóxico peroxinitrito levando a aumento da resposta inflamatória²⁹.

O papel do AM na inibição da ação do óxido nítrico foi descrito por diversos autores^{18,20,22,23,30,31}. Sua ação se deve a um mecanismo de competição onde o AM se liga ao ferro da molécula heme da guanilatociclase solúvel, levando a ativação enzimática e inibição da produção do cGMP.

O efeito protetor do AM sobre os pulmões já foi estudado em modelos experimentais de isquemia e reperfusão intestinal¹², porém, até o presente, não há nenhum estudo relacionado ao papel do AM como possível agente protetor contra a lesão de IR em transplante pulmonar.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos do azul de metileno como droga inibidora da lesão de IR em ratos submetidos a transplante pulmonar.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar se o azul de metileno utilizado em ratos submetidos ao transplante pulmonar foi eficaz quanto a:

- Redução da resposta inflamatória consequente a lesão de isquemia e reperfusão;
- Diminuição na formação de edema e hemorragia alveolar dos enxertos;
- Atenuação da ocorrência de apoptose.

3 MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e pela Comissão de Ética para a Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HCFMUSP – Protocolo 3387/09/138 (Anexo). A coleta e análise dos dados foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica (LIM 61) em colaboração com o Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiologia da Circulação (LIM 11).

A execução dos procedimentos foi balizada pelos princípios éticos da experimentação animal, regidos pela lei federal número 11 794 de oito de outubro de 2008, regulamentada pelo decreto número 6 899 de 15 de julho de 2009. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.1 Animais e grupos

Foram utilizados 80 ratos fêmeas da raça Sprague Dawley, pesando entre 300 e 350g, o que corresponde a uma idade em torno de oito semanas. Ao todo, foram realizados 40 transplantes pulmonares unilaterais esquerdos. Quarenta animais foram submetidos à cirurgia para a retirada do enxerto para transplante e outros 40 participaram como receptores, os quais foram os sujeitos da pesquisa.

A opção pela utilização de animais fêmeas foi devido a questões logísticas envolvendo a realização de diversas pesquisas simultâneas no laboratório, de forma que houvesse a disponibilidade de grande quantidade de animais para o estudo. Além disto, não há qualquer evidência na literatura que esteja relacionada a alterações na avaliação dos resultados de transplantes de roedores fêmeas. Da mesma forma, em estudo retrospectivo realizado em

pacientes humanos submetidos a transplante pulmonar, o gênero não interferiu nos resultados relacionados à DPE³².

Devido à constatação de que ratos da raça Wistar, anteriormente utilizados em estudos de IR em transplante pulmonar, podem apresentar alterações da permeabilidade vascular por um fenômeno imune de alergia a dextrana, composto presente na solução de preservação LPD (Perfadex[®]) utilizado neste experimento, optamos por utilizar animais da raça Sprague Dawley, o que aparentemente reduz a possibilidade deste tipo de reação alérgica^{33,34}.

A fase laboratorial cirúrgica estendeu-se por quatro semanas, sendo realizadas duas cirurgias por dia. Ao final, analisamos os 40 animais que completaram os experimentos.

Os animais foram divididos em quatro grupos, onde todos foram submetidos a transplante pulmonar e estiveram expostos aos fenômenos da lesão de IR. No grupo controle, administramos 2 mL de solução salina a 0,9% na cavidade peritoneal dos animais receptores, enquanto que no grupo experimento, administramos 2 mL de solução de AM a 1% (50 mg/Kg). A injeção das drogas foi realizada logo após a intubação dos animais, antes do início do transplante.

Os grupos foram, ainda, igualmente subdivididos de acordo com o tempo de isquemia fria a qual os enxertos foram submetidos, sendo de 3 horas ou 6 horas. Em todos os casos, o tempo de reperfusão foi de 2 horas. Desta maneira, trabalhamos com dois grupos controle (SAL) e dois grupos experimento (AM).

O Quadro 1 mostra a distribuição dos animais em quatro grupos conforme os diferentes tempos de isquemia (3 ou 6 horas) e a solução administrada.

Quadro 1– Desenho experimental

Grupos	Nº de ratos	Tempo de isquemia	Tempo de reperfusão	Solução
SAL	10	3 horas	2 horas	Salina 0,9%
	10	6 horas	2 horas	
AM	10	3 horas	2 horas	Azul de metileno 1%
	10	6 horas	2 horas	

3.2 Procedimento cirúrgico

3.2.1 Animais doadores

Após serem sedados em câmara de acrílico com isoflurano a 5% (Forane®, Abbott), os animais foram intubados por via orotraqueal com cânula de polietileno apropriada, utilizando-se um laringoscópio pediátrico adaptado para pequenos animais, e conectados ao ventilador mecânico de roedores (modelo 683; Harvard Apparatus) (Figura 2).



Figura 2 – Ventilador mecânico de roedores

A anestesia geral foi mantida com 2% de isoflurano (Forane[®], Abbott) em oxigênio puro distribuídos pelo isovapor (modelo 1224, K. Takaoka).

Os animais foram ventilados com volume corrente de 10 mL/kg e a frequência respiratória de 80 ciclos/minuto. Pressão expiratória final de três cm H₂O foi mantida, com o intuito de evitar atelectasia pulmonar.

Após laparotomia mediana, heparina sódica (500 U) foi injetada por meio de punção da veia cava inferior, conforme mostrado na Figura 3.

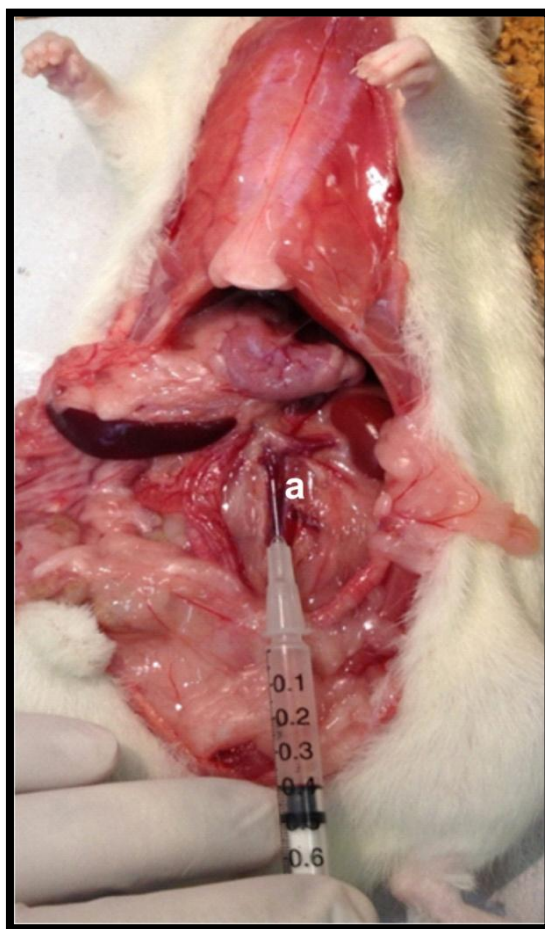


Figura 3 – Laparotomia mediana e exposição da veia cava inferior para heparinização do animal (a: veia cava inferior)

A seguir, os órgãos torácicos foram expostos por meio de esternotomia mediana, conforme apresentado na Figura 4. Essa exposição se fez necessária para a manipulação de todo o bloco cardiopulmonar.

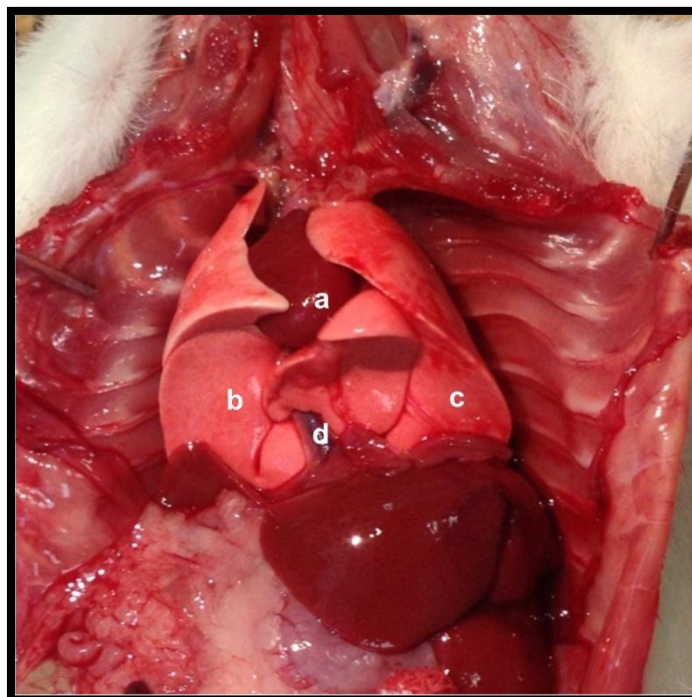


Figura 4 – Exposição do bloco cardiopulmonar obtida por meio de esternotomia mediana (a: coração, b: pulmão direito, c: pulmão esquerdo, d: veia cava inferior)

O próximo passo foi a canulação da artéria pulmonar com o objetivo de realizar a perfusão anterógrada dos pulmões com solução Low Potassium Dextran (LPD) (Perfadex[®]) a 4°C e pressão constante de 20 cm H₂O (Figura 5). Esta canulação foi realizada por meio de pequena abertura do ventrículo direito, próximo a emergência do tronco da artéria pulmonar, suficiente para a introdução de uma sonda de plástico de calibre 6F. A escolha da solução de preservação e a temperatura de conservação mimetizaram o que ocorre com o transplante pulmonar em seres humanos¹.

Antes de iniciar a perfusão, seccionamos a veia cava inferior para diminuir o retorno venoso e amputamos a aurícula esquerda para drenagem da solução de preservação.

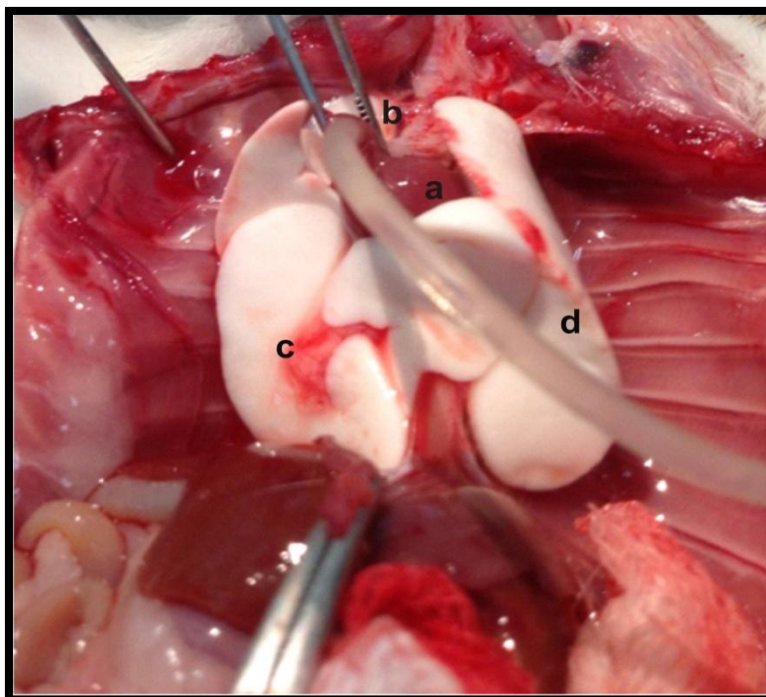


Figura 5 – Abertura do ventrículo direito e perfusão pulmonar anterógrada com solução LPD (a: coração, b: artéria pulmonar, c: pulmão direito, d: pulmão esquerdo)

Após os pulmões estarem completamente perfundidos com a solução de preservação, procedeu-se a retirada do bloco cardiopulmonar com os pulmões mantidos em insuflação por meio da oclusão da traqueia por um fio de seda zero (Figura 6). O objetivo de manter a insuflação pulmonar foi prevenir a atelectasia do órgão.

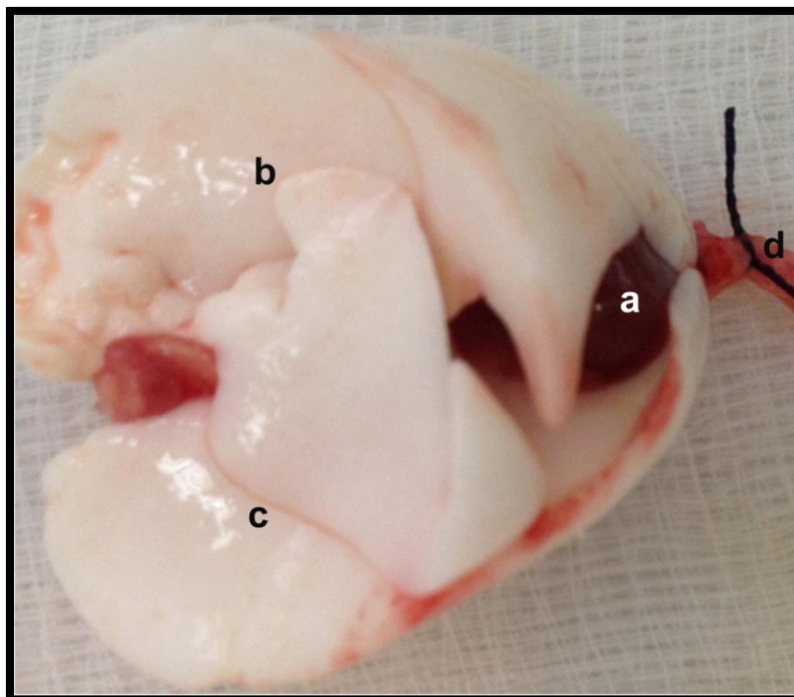


Figura 6 – Bloco cardiopulmonar retirado do animal doador e mantido em insuflação por meio de oclusão traqueal (a: coração, b: pulmão direito, c: pulmão esquerdo, d: traqueia)

Procedeu-se a eutanásia dos animais por secção da artéria aorta abdominal.

O bloco cardiopulmonar foi removido, dissecado, e então o pulmão esquerdo preparado para o implante por meio da colocação de *cuffs* na artéria, veia e brônquio. Estes *cuffs* foram confeccionados com a utilização de dispositivos para acesso venoso periférico número 16 Gauge (G). As estruturas do hilo pulmonar passavam através dos *cuffs* e tinham o seu endotélio invertido ao redor da circunferência dos mesmos, sendo fixados por um fio monofilamentar 7.0, conforme técnica descrita previamente^{35,36,37}. Os enxertos foram acondicionados em recipientes fechados, embebidos em solução de preservação, e acondicionados em geladeira a 4°C.

3.2.2 Animal receptor

3.2.2.1 *Pneumectomy and implant of the graft*

O animal receptor foi submetido à mesma rotina anestésica descrita para o animal doador. Logo após a intubação orotraqueal e instalação da ventilação mecânica, um balão de Mylar foi conectado a saída expiratória do aparelho de anestesia por três minutos para que fosse obtida a coleta inicial do óxido nítrico exalado (NOex).

Imediatamente antes do início do procedimento cirúrgico para implante do enxerto no receptor, este foi submetido à punção abdominal e injeção intraperitoneal de 2 mL de solução salina 0,9% no grupo controle ou 2 mL de solução de AM 1% no grupo experimento.

Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e submetidos à toracotomia esquerda com acesso a cavidade pleural para a realização da pneumectomy.

A seguir, o implante do enxerto foi feito com o auxílio de microscópio estereoscópico (ZEISS, mod. Stemi DRC, Germany), com aumento de oito e 16x (Figuras 7, 8 e 9). O implante iniciava-se com uma secção da parede da artéria, progredindo-se o *cuff* da artéria do doador para o interior da artéria receptora, seguido por fixação das estruturas com fio monofilamentar 7.0. Este mesmo procedimento foi realizado para o brônquio e veia, nesta ordem^{35,36,37}.



Figura 7 – Microscópio óptico utilizado para a dissecação do hilo pulmonar e implante dos enxertos

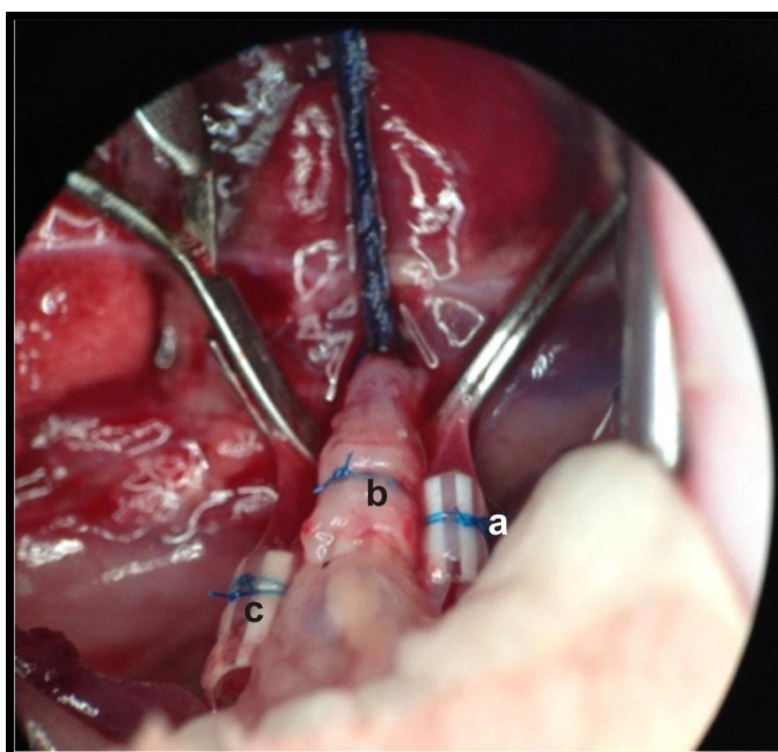


Figura 8 – Anastomose dos elementos do hilo pulmonar realizada pela técnica dos cuffs com auxílio do microscópio óptico (aumento de 16X) (a: artéria pulmonar, b: brônquio principal esquerdo, c: veia pulmonar)



Figura 9 – Enxerto pulmonar insuflado após anastomose brônquica

O fechamento do receptor foi feito por planos separados com fio de mononylon 2.0, deixando-se um dreno torácico para retirada de ar e secreções do espaço pleural até o término do procedimento.

Após o término do ato cirúrgico, os animais receberam analgesia (dipirona sódica, 10 mg/kg) por via orogástrica e foram deixados acordados, em ventilação espontânea, em gaiola individual, recebendo água e ração *ad libitum*.

3.2.2.2 Eutanásia dos animais e coleta de amostras

Passadas duas horas de reperfusão do enxerto, os animais foram novamente anestesiados, intubados e colocados sob ventilação mecânica, segundo os parâmetros já citados. Nessas condições, novamente foi feita a dosagem do NOex conforme descrito anteriormente, para comparação com os valores iniciais. Os animais foram, então, submetidos à laparotomia mediana

(Figura 10) para que fossem coletadas amostras do sangue arterial por meio de punção da aorta abdominal com retirada de 1 mL para a análise da PaO_2 . No mesmo momento, uma amostra de 1 mL de sangue venoso foi coletado da veia cava inferior e armazenado para a dosagem bioquímica.

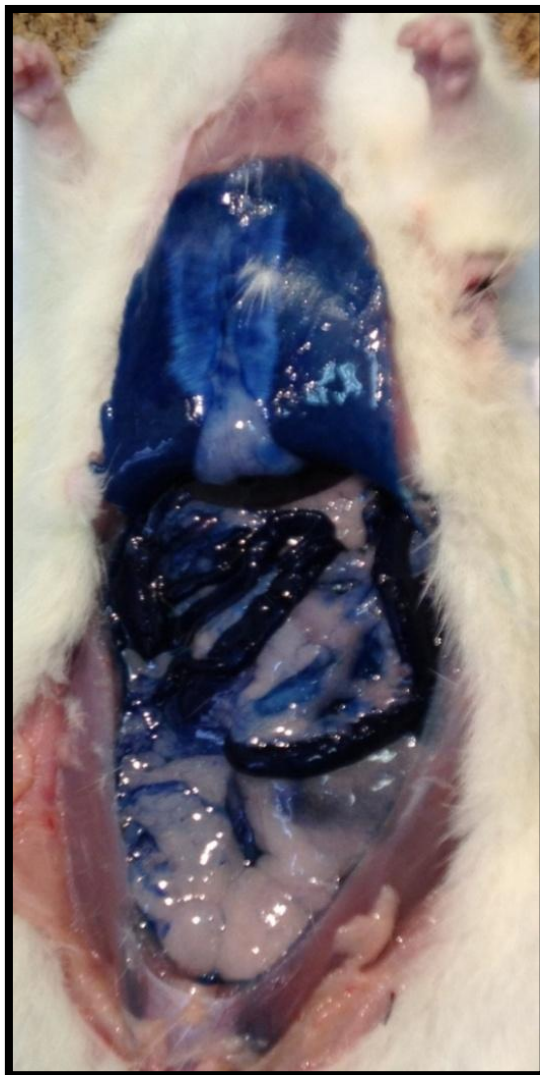


Figura 10 – Laparotomia mediana e exposição da cavidade peritoneal para coleta de sangue arterial e venoso em animal do grupo AM

Imediatamente após, os animais foram submetidos à esternotomia mediana, dissecação da traqueia, traqueostomia e introdução de cateter 16 G para coleta do lavado broncoalveolar. Realizou-se a instilação de 3 mL de solução salina 0,9%. A solução instilada foi aspirada e o conteúdo obtido, submetido à contagem celular total e diferencial e dosagem de citocinas

inflamatórias [interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Cinc-1].

Procedeu-se a eutanásia dos animais por meio de incisão da artéria aorta abdominal, com retirada subsequente do bloco cardiopulmonar, incluindo o enxerto.

A seguir, os blocos foram armazenados em solução de formaldeído a 4% por um período de 24 horas e, posteriormente, mantidos em solução de álcool etílico 70% até que fosse realizado o preparo de lâminas para o estudo histopatológico e imunohistoquímico. A troca das soluções fez-se necessária porque a conservação em formaldeído por tempo excessivo prejudica o processamento das lâminas pelo método de imunohistoquímica.

3.3 Análise gasométrica – medida da PaO₂

As amostras para análise gasométrica foram coletadas para determinação da PaO₂ (Radiometer, mod. ABL555). A amostra foi mantida em seringa de 1 mL, previamente heparinizada, em temperatura ambiente, e imediatamente levada ao aparelho de leitura, a qual foi realizada considerando-se a temperatura do sangue como 37°C e o resultado automaticamente impresso.

3.4 Dosagem do óxido nítrico exalado (NOex)

Com os animais conectados ao ventilador, os níveis de NOex foram coletados na saída expiratória do mesmo utilizando um balão de Mylar durante três minutos. Para evitar a contaminação ambiental, um filtro de NO zero (Sievers Instruments, Inc.) foi anexado na válvula inspiratória do circuito de ventilação (Figura 11).

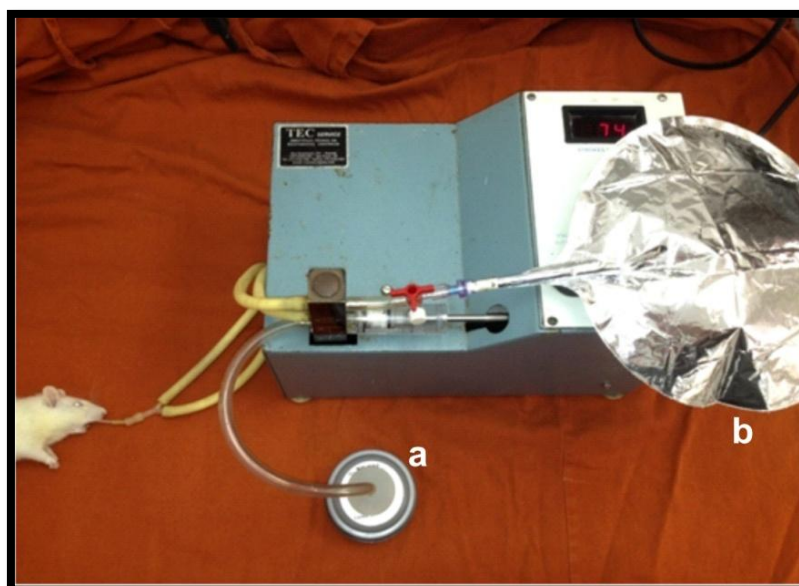


Figura 11 – Animal em ventilação mecânica sendo submetido a coleta do NOex (a: Filtro de NO, b: balão de Mylar)

Foram realizadas duas dosagens em cada animal receptor, sendo a primeira, para a aferição dos níveis basais ou iniciais de NOex realizada logo após a intubação orotraqueal e instalação da ventilação mecânica, antes do início do procedimento cirúrgico e, a segunda, após o período de reperfusão do enxerto, no momento em que o animal foi novamente anestesiado e colocado sob ventilação mecânica para a eutanásia.

As concentrações de NOex foram medidas por quimioluminescência usando o analisador de NOA 280 (Sievers Instruments, Inc., Boulder, CO). Antes de cada medição, o analisador foi calibrado com um gás de NO na concentração de 47 ppb (partículas por bilhão) (White Martins)³⁸.

3.5 Coleta e análise do lavado broncoalveolar – citologia

O LBA foi realizado por instilação traqueal de uma alíquota de 3 mL de solução salina a 0,9%. O material coletado foi centrifugado a 1 000 rotações por minuto por 10 minutos a 5°C. Depois da centrifugação e retirada do sobrenadante, o *pellet* celular foi ressuspensionado com 1 mL de PBS para a

contagem do número total de células realizada em câmara de Neubauer. Em seguida, foram confeccionadas lâminas de cytopspin (modelo Cytospin-2, *Shandon Instruments* Sewickley, PA), que foram posteriormente coradas com Diff-Quik para a contagem diferencial celular (300 células/lâmina)³⁹ (Figura 12). O sobrenadante foi estocado a -70°C e utilizado para a dosagem de citocinas, pelo método imunoenzimático.

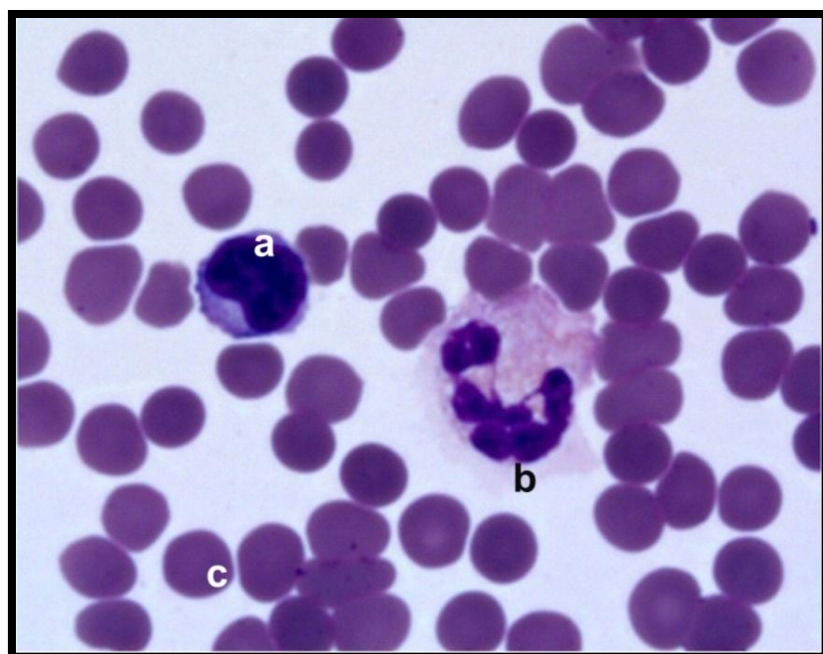


Figura 12 – Contagem diferencial celular no lavado broncoalveolar (a: linfócito, b: polimorfonuclear, c: hemáceas)

3.6 Análise bioquímica – dosagem do ácido úrico

A dosagem do ácido úrico foi realizada pelo laboratório central do HCFMUSP pelo método enzimático colorimétrico, utilizando-se o kit UA plusCobas®. A amostra foi incubada com uma mistura de reagentes que contém ascorbato oxidase e um sistema de aclaramento. Neste sistema, é importante que o ácido ascórbico presente na amostra seja eliminado no decorrer da reação preliminar, impedindo a interferência do mesmo com a

subsequente reação do indicador peroxidase. Depois da reação do reagente inicial, começa a oxidação do ácido úrico pela uricase. O peróxido reage na presença de peroxidase, N-etil-2-hidroxi-3-sulfopropil-3-metilanilina e 4-aminofenazona e forma um corante quinona-imina. A intensidade da cor vermelha formada é proporcional à concentração do ácido úrico e é determinada fotometricamente⁴⁰.

3.7 Análise histopatológica – microscopia óptica

Foram realizados cortes de 5 µm em amostras de pulmão incluídas em parafina, que foram coradas com hematoxilina e eosina.

Para determinar os índices das diferentes células e estruturas analisadas foi utilizada a técnica histomorfométrica do *point-counting*, utilizando retículo de Weibel contendo 100 pontos e 50 retas. Utilizando-se o aumento de 400X, foram examinados dez campos microscópicos aleatórios e não-coincidentes, totalizando 1 000 pontos por lâmina, cobrindo uma área de 62 500µm² por campo analisado.

Áreas do eixo broncovascular e dos septos interlobulares foram evitadas durante as medições das áreas dos septos alveolares.

Para corrigir os dados, tendo em vista as diferenças de expansão dos tecidos das biópsias estudadas – fator que não pode ser controlado durante a confecção das lâminas –, não foram considerados os pontos que não incidiram em área sólida. Os valores foram expressos em porcentagem de pontos positivos do total de pontos em áreas sólidas, segundo a fórmula:

$$P_{\text{PONTOS}} = \frac{(P_i \times 100)}{P_{\text{PARÊNQUIMA}}}$$

P_{PONTOS} é a porcentagem corrigida de pontos das células (notamente neutrófilos) ou estruturas analisadas; P_i é o número de pontos que incidem sobre as células ou estruturas analisadas e P_{PARÊNQUIMA} é o total de pontos que

incidiram sobre área sólida. A P_{PONTOS} de cada célula ou estrutura analisadas em cada caso foi calculada a partir da soma dos resultados P_i e $P_{\text{PARÊNQUIMA}}$ de todos os campos analisados para cada animal⁴¹.

As avaliações do diferencial celular e do edema foram realizadas nos espaços perivascular e perialveolar.

A Figura 13, a seguir, exemplifica a análise histopatológica pela técnica do *point counting*.

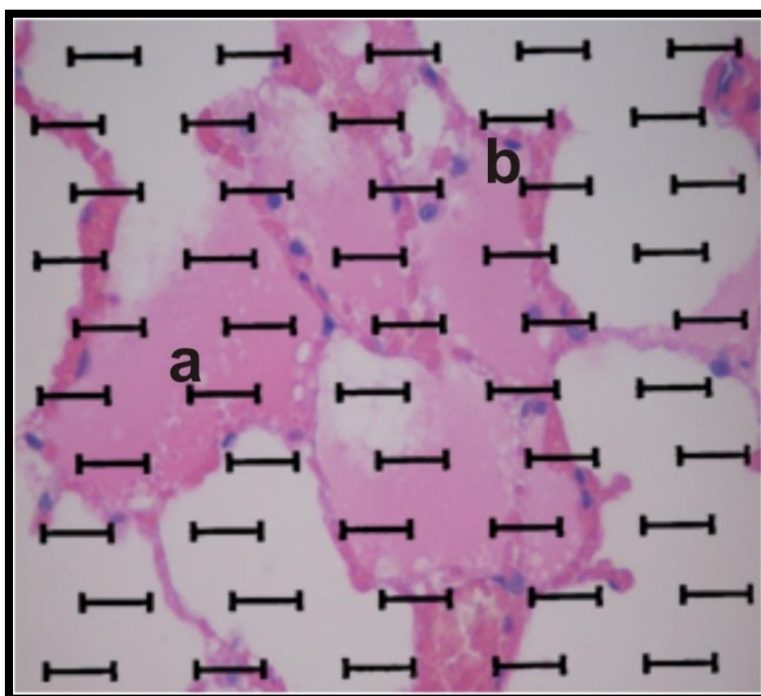


Figura 13 – Análise histopatológica pela técnica do *point counting*, utilizando retículo de Weibel. (a: edema, b: neutrófilo)

3.8 Ensaio imunoenzimático – citocinas

As dosagens das citocinas TNF- α , IL-6 e Cinc-1 foram realizadas pelo método de ELISA, utilizando-se o material obtido por meio da realização do lavado broncoalveolar, conforme exposto anteriormente. Seguimos as recomendações do fabricante do kit DUO SET (R&D System[®], CA, USA).

Os anticorpos de captura (100 μ L/poço), em tampão carbonato, foram incubados com as amostras em placas contendo 96 poços a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes para a retirada do excesso de anticorpos e incubadas por uma hora a temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) e a seguir adicionadas as amostras e o recombinante de citocina (para a curva padrão em diluição seriada de concentrações previamente definidas, em duplicatas) em cada poço e incubadas por duas horas à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas cinco vezes com o PBS-T. Após, foram adicionados anticorpos anticitocinas (100 μ L/poço) marcados com biotina e streptavidina conjugada com peroxidase. As placas foram incubadas por uma hora, a temperatura ambiente, e lavadas com PBS-T por sete vezes. Em seguida, foi adicionado 100 μ L/poço do substrato TMB 1:1 para revelação. A reação foi interrompida usando 50 μ L/poço de ácido fosfórico, e lida em 450 nM em leitor de ELISA (Molecular Devices) utilizando o software SOFTMAX²⁹. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL).

A expressão das citocinas pró inflamatórias TNF- α e IL-6 acontece em consequência da estimulação de macrófagos ativados⁴², já o Cinc-1 é uma quimiocina pertencente a família CXC, responsável não só pela atividade quimiotática de neutrófilos, mas também participa da fagocitose, indução de moléculas de adesão e ativação da função neutrofílica⁴³.

3.9 Imunohistoquímica

As caspases são uma classe de mediadores envolvidos com a apoptose caspase 3 é uma protease frequentemente ativada no processo de morte celular, por participar da quebra de proteínas celulares chave^{44,45,46,47,48}.

A expressão da caspase 3 foi avaliada pela análise de lâminas preparadas pelo método de imunohistoquímica. A metodologia utilizada foi a padronizada pelo laboratório de imunohistoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP⁴⁹.

Os cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos de material embebido em parafina em lâminas previamente silanizadas com solução de 3-aminopropyltiethoxy-silane. Os cortes foram submetidos à desparafinização em banho de vinte minutos em xilol à temperatura ambiente. Posteriormente, foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70%) por cinco minutos cada. A seguir, procedeu-se à lavagem em água corrente e em água destilada deionizada por cinco minutos cada.

Iniciou-se a recuperação antigênica, realizada em panela a vapor, na qual foi colocado o berço com as lâminas em cuba com solução de citrato 10 mM, pH 6,0 à 95 –100°C por 35 minutos. Após, a cuba permaneceu 20 minutos em temperatura ambiente.

Realizou-se, então, a lavagem em tampão fosfato de sódio por três vezes, três minutos cada. Foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas, lavando-se as lâminas em peróxido de hidrogênio 3%, sete vezes por cinco minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes em água corrente, três vezes em água destilada e mais três vezes em PBS, cada lavagem durando três minutos.

O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado colocando-se as lâminas em leite desnatado 2% diluído em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente.

As lâminas foram, em seguida, escorridas e secas ao redor do corte. O anticorpo primário foi pingado nas lâminas já preparadas. A diluição deste anticorpo foi feita em soro albumina bovina.

As lâminas foram cobertas com 100 µL dessa solução e permaneceram incubadas em câmara úmida em geladeira durante 18 horas. Após, foram lavadas em PBS três vezes por três minutos. Foram, então, incubadas com o anticorpo secundário comercializado já pronto para uso, conforme a seguinte sequência de utilização: primeiramente foi incubado o anticorpo secundário por uma hora a 37°C, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com estreptoavidina-biotinilada peroxidase por 45 minutos a 37°C. Foram realizados três banhos por três minutos em PBS.

A revelação da imunohistoquímica foi realizada com o emprego do cromógeno (3-3'-diaminobenzamida – DAB 100 mg em 70 mL de PBS + 3 ml de água oxigenada) por cinco minutos.

Posteriormente, procedeu-se a lavagem com água corrente por mais cinco minutos e, em seguida, os cortes foram contracorados em hematoxilina de Harris por 30 segundos. Novamente foram lavadas em água corrente por cinco minutos e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 95%, 100%), três vezes em cada.

Finalmente, os cortes foram diafanizados em xilol por três vezes e montados com lamínula e Entelan, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24h. A diluição padronizada para o preparo das lâminas foi de 1:400.

Para determinar o índice de expressão do antígeno, utilizamos a técnica do point counting conforme descrito anteriormente para a análise histopatológica do edema e infiltrado celular⁴¹. Foram consideradas como células positivas aquelas coradas em marrom (Figura 14). Desta forma, determinamos o percentual de células positivas, ou em apoptose.

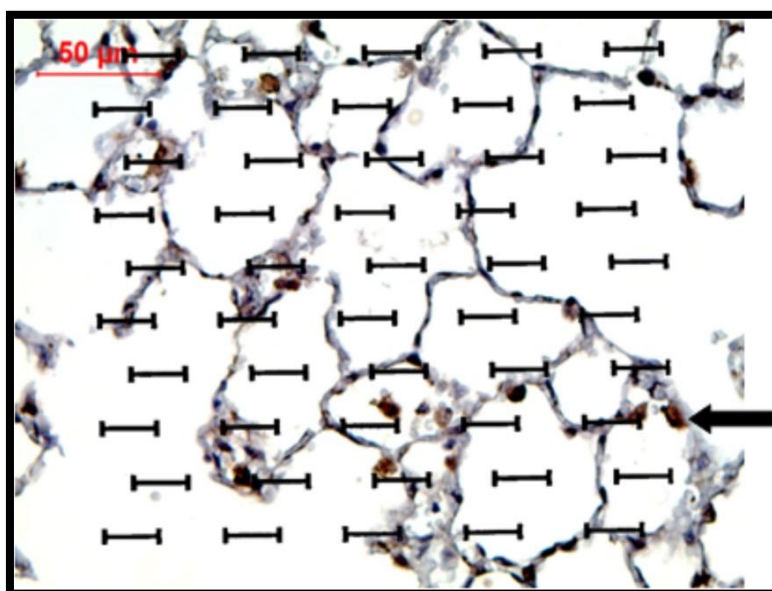


Figura 14 – Avaliação da apoptose por quantificação da caspase 3 pelo método de imunohistoquímica. As células coradas em marrom (seta) encontram-se em apoptose

3.10 Análise estatística

3.10.1 Análise estatística descritiva

As análises descritivas para os dados quantitativos com distribuição normal foram realizadas apresentando-se as médias e, respectivos, desvios padrão (DP). Os dados quantitativos sem distribuição normal foram expressos pelas medianas acompanhadas dos intervalos interquartil IQ (25% – 75%). Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados, respectivamente, com os testes de Shapiro-Wilk e Levene.

3.10.2 Análise estatística inferencial

Para as variáveis quantitativas dependentes, nas quais foram analisados dois fatores (grupos e tempo), foi utilizado o teste ANOVA de duplo fator. Quando não se verificou distribuição normal e homogeneidade de variância das variáveis, recorreu-se ao teste não-paramétrico Mann-Whitney para cada fator.

Foi considerada uma probabilidade de erro do tipo I (α) de 0,05 em todas as análises inferenciais.

As análises estatísticas descritivas e inferenciais foram executadas com o software SPSS versão 13 (SPSS 13.0 for Windows).

4 RESULTADOS

4.1 Análise gasométrica – PaO₂

Houve diferença estatisticamente significativa na dosagem da PaO₂, entre os grupos AM e salina (SAL), nos animais submetidos ao tempo de isquemia de 3 horas (AM = 150,2 IQ = 50,1 mmHg; vs Salina = 102,6 IQ = 40,4 mmHg; p = 0,028) (Figura 15).

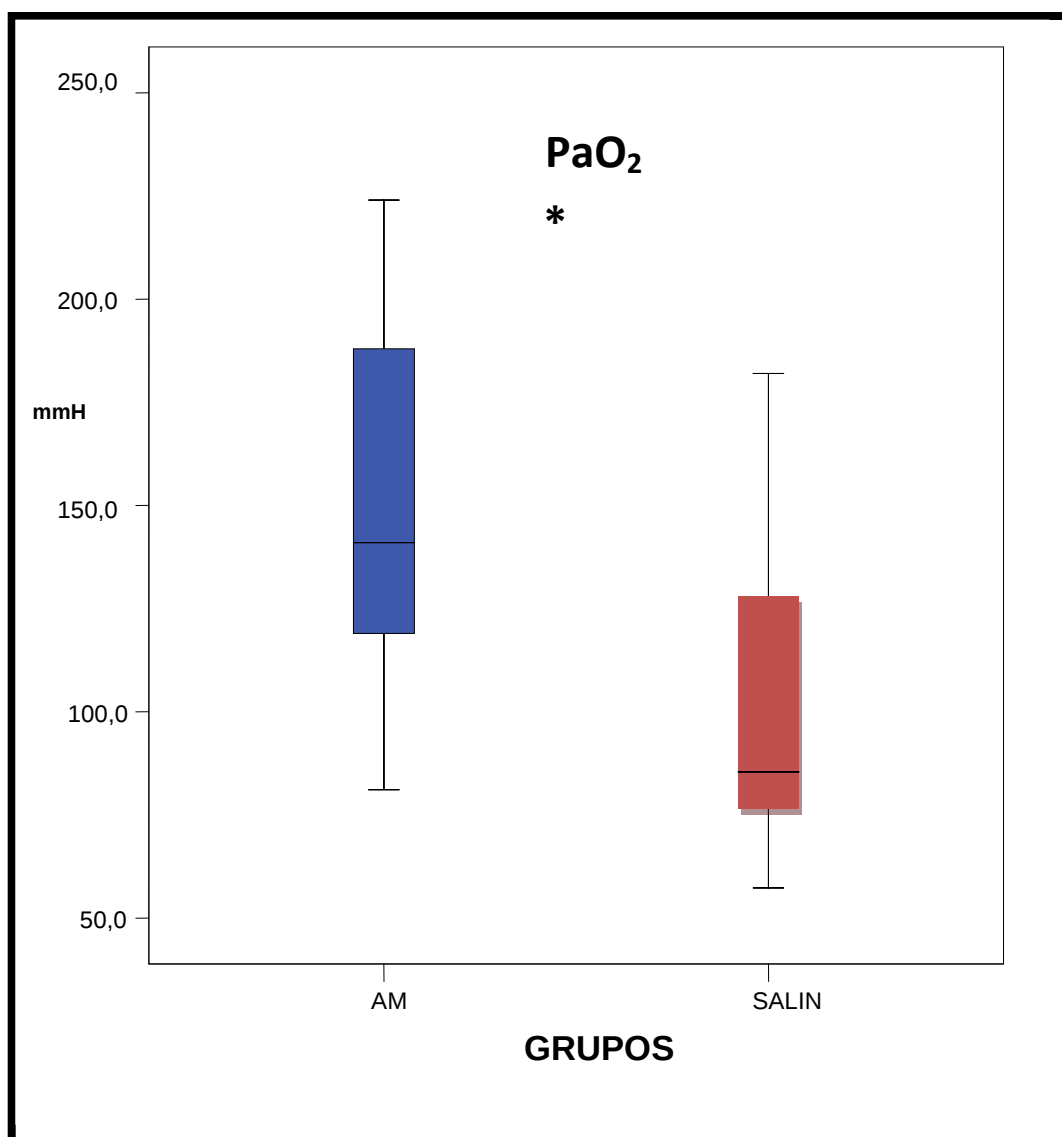


Figura 15 – Quantificação da PaO₂ por gasometria arterial. Grupos com 3 horas de isquemia (p = 0,028). *: p < 0,05 (AM: azul de metileno)

Entretanto, entre os animais submetidos a 6 horas de isquemia, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos AM e SAL (AM = 169,7 IQ = 60,9 mmHg vs Salina = 199,5 IQ = 99,3 mmHg; $p = 0,472$) (Figura 16).

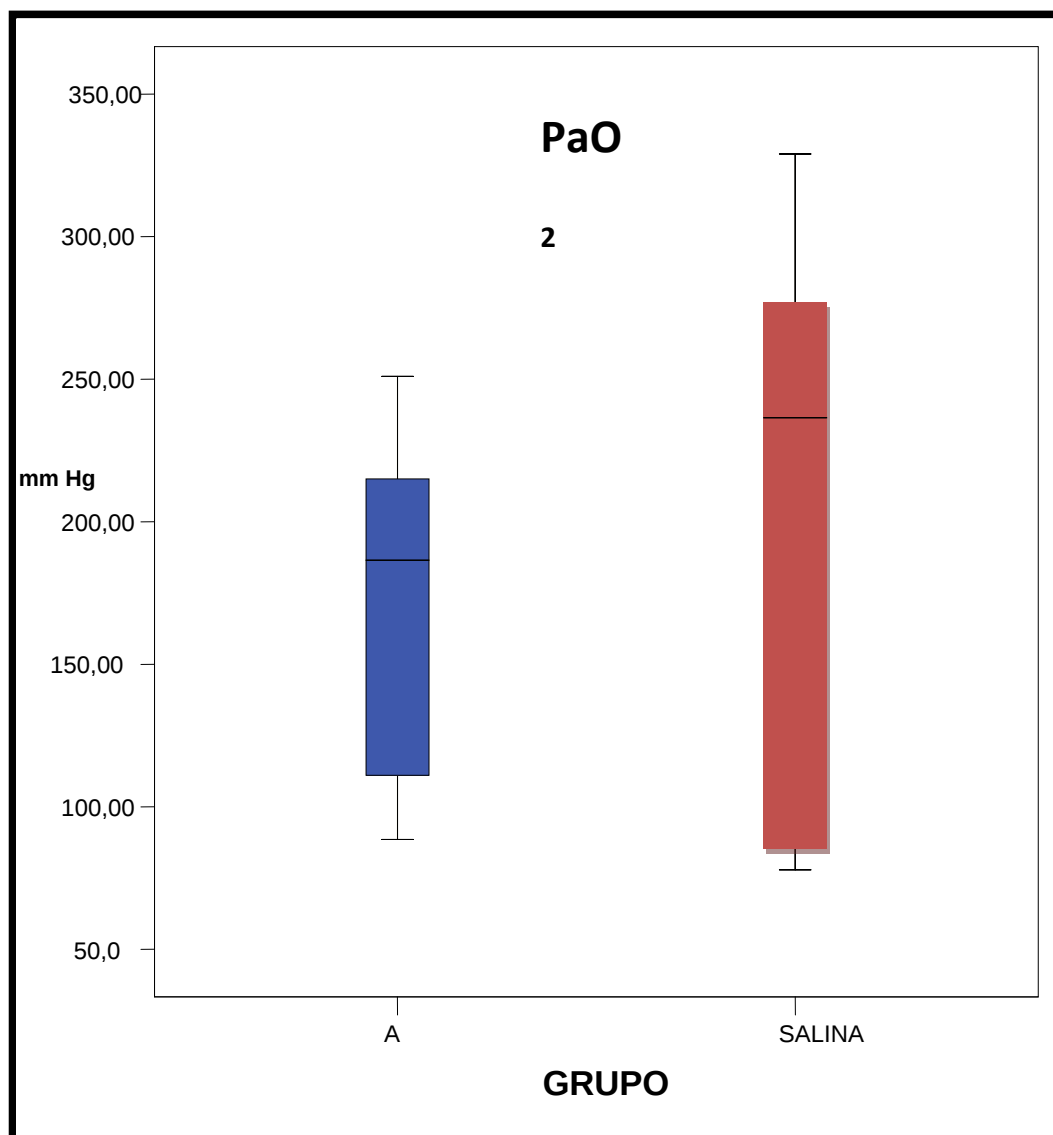


Figura 16 – Quantificação da PaO₂ por gasometria arterial. Grupos com 6 horas de isquemia ($p = 0,472$); (AM: azul de metileno)

4.2 Dosagem do óxido nítrico exalado

4.2.1 Dosagem do óxido nítrico exalado inicial

As dosagens iniciais do NOex não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos de animais submetidos aos tempos de isquemia de 3 horas e 6 horas (3 h – AM = $4,5 \pm 1,1$ vs Salina = $3,9 \pm 2,2$ ppb, $p = 0,534$; 6 h – AM: $5,1 \pm 3,0$ vs Salina: $4,1 \pm 1,9$ ppb, $p = 0,444$) (Figura 17).

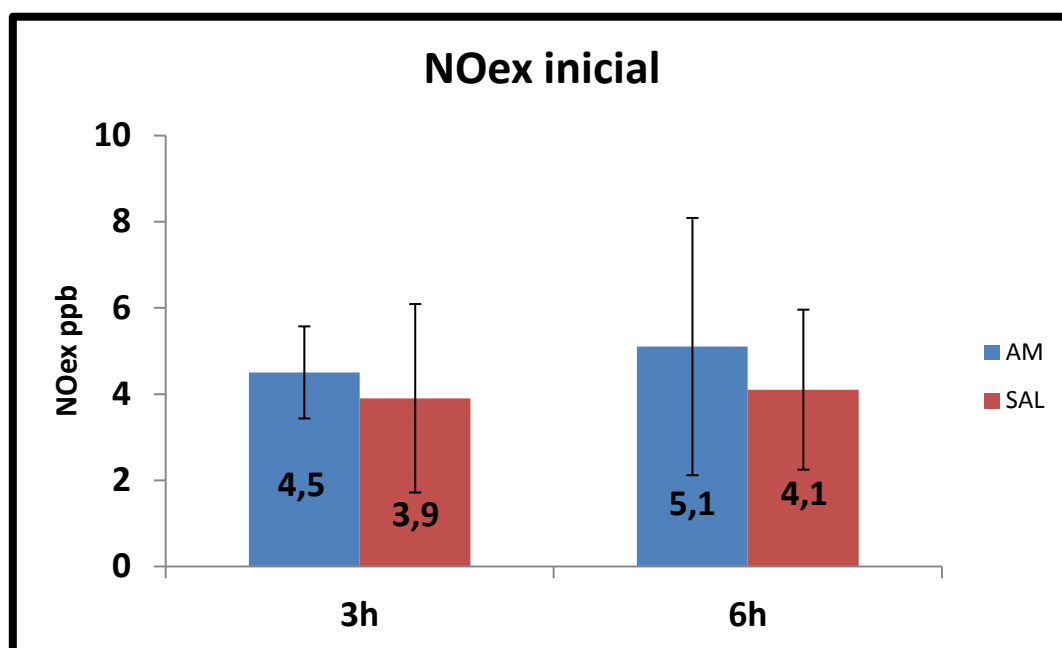


Figura 17 – Dosagem do NOex inicial. Grupos com 3 horas ($p = 0,534$) e 6 horas ($p = 0,444$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina)

4.2.2 Dosagem do óxido nítrico exalado final

Em relação à dosagem final do NOex, houve diferença estatisticamente significativa entre os animais dos grupos AM e SAL submetidos à 3 horas de

isquemia. Para aqueles submetidos à 6 horas de isquemia, não houve diferença (3 h – AM = $3,2 \pm 2,0$ vs Salina = $5,2 \pm 2,3$ ppb, $p = 0,05$; 6 h – AM = $3,7 \pm 2,5$ vs Salina = $4,1 \pm 2,1$ ppb, $p = 0,713$) (Figura 18).

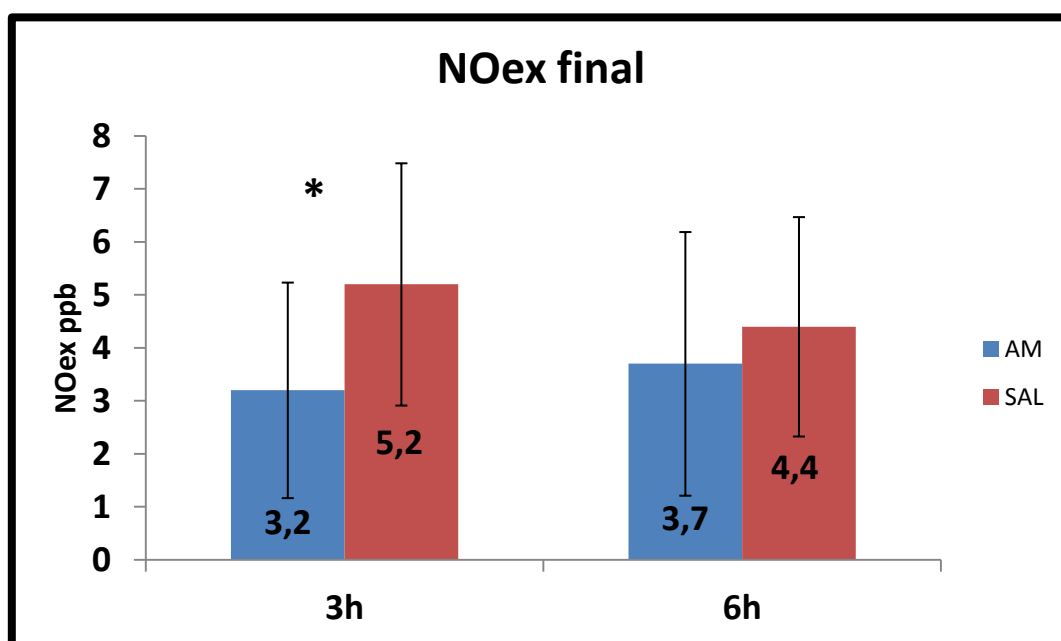


Figura 18 – Dosagem do NOex final. Grupos com 3 horas ($p = 0,05$) e 6 horas ($p = 0,713$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina). *: $p < 0,05$

4.3 Análise do lavado broncoalveolar

4.3.1 Citologia

4.3.1.1 Contagem celular total

A contagem total de células no lavado broncoalveolar não apresentou diferença entre os grupos AM e SAL submetidos a 3 horas e 6 horas de isquemia (3 h – AM = $82,2 \pm 18,2$ vs Salina = $90,8 \pm 36,9 \times 10^4$, $p = 0,544$; 6 h – AM = $76,9 \pm 18,6$ vs Salina = $94,1 \pm 30,9 \times 10^4$, $p = 0,225$) (Figura 19).

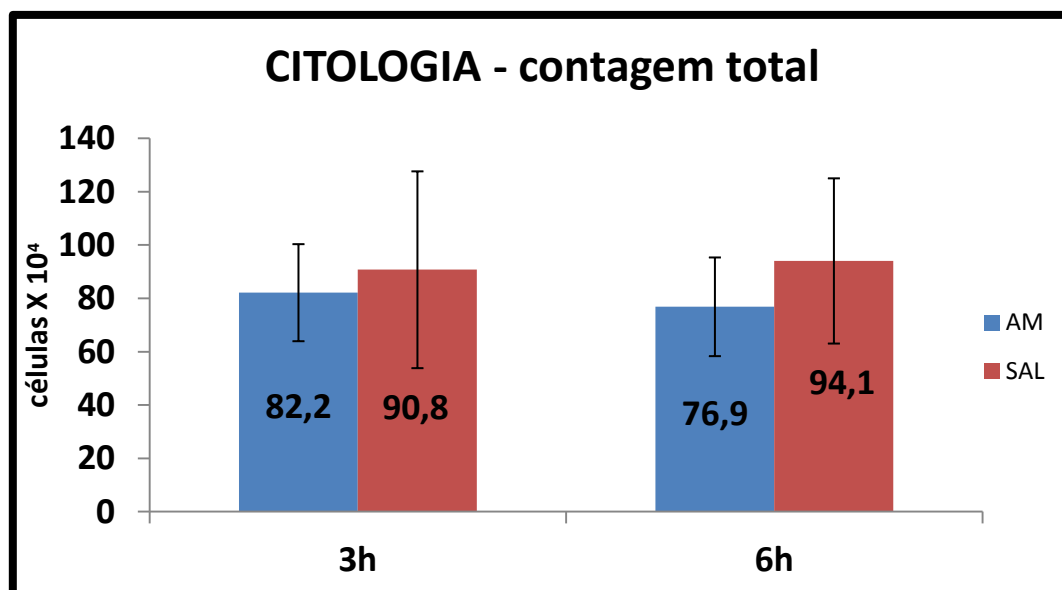


Figura 19 – Contagem total de células no lavado broncoalveolar. Grupos com 3 horas ($p = 0,544$) e 6 horas ($p = 0,225$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina)

4.3.1.2 Citologia – contagem de neutrófilos

O número de neutrófilos foi menor no grupo AM em relação ao grupo SAL nos diferentes tempos de isquemia, sendo esta diferença estatisticamente significativa para os animais dos grupos submetidos a 6 horas de isquemia. (3 h – AM = $21,9 \pm 12,1$ vs Salina = $33,5 \pm 17,9 \times 10^4$, $p = 0,138$; 6 h – AM = $11,8 \pm 7,4$ vs Salina = $30 \pm 19,2 \times 10^4$, $p = 0,023$) (Figura 20).

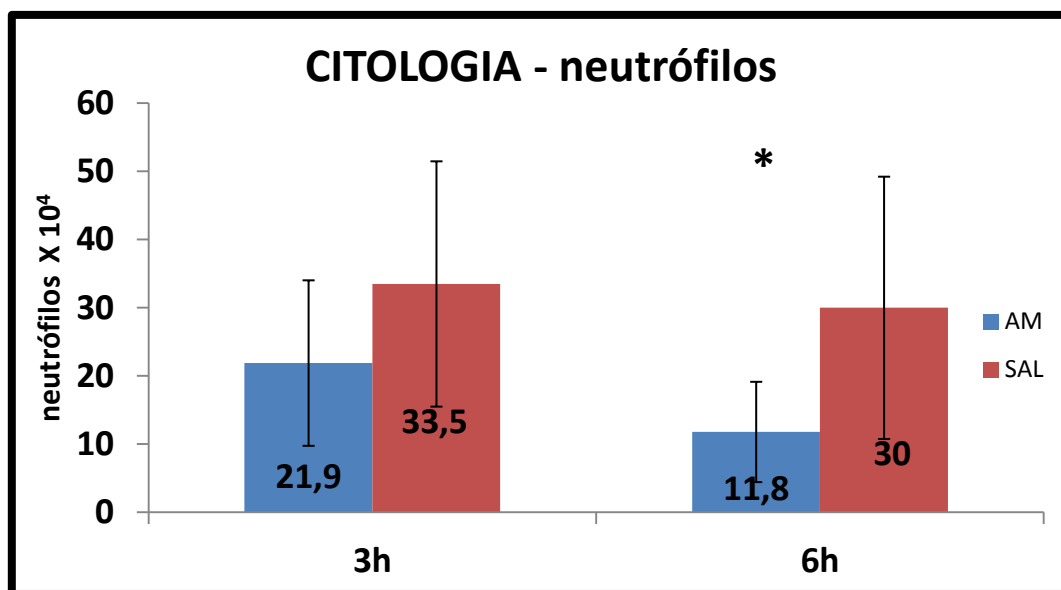


Figura 20 – Contagem de neutrófilos no lavado broncoalveolar. Grupos com 3 horas ($p = 0,138$) e 6 horas ($p = 0,023$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina). *: $p < 0,05$

Não houve diferença estatística entre os grupos quando comparamos os demais tipos celulares no lavado broncoalveolar.

4.3 Análise bioquímica – dosagem do ácido úrico

A dosagem do ácido úrico venoso foi significativamente maior no grupo AM em relação ao grupo SAL nos tempos de isquemia de 3 horas e 6 horas (3 h – AM = $4,7 \pm 0,9$ vs Salina = $2,7 \pm 0,7$ mg/mL, $p = 0,003$; 6 h – AM = $5,3 \pm 2,4$ vs Salina = $2,3 \pm 0,9$ mg/mL, $p < 0,001$) (Figura 21).

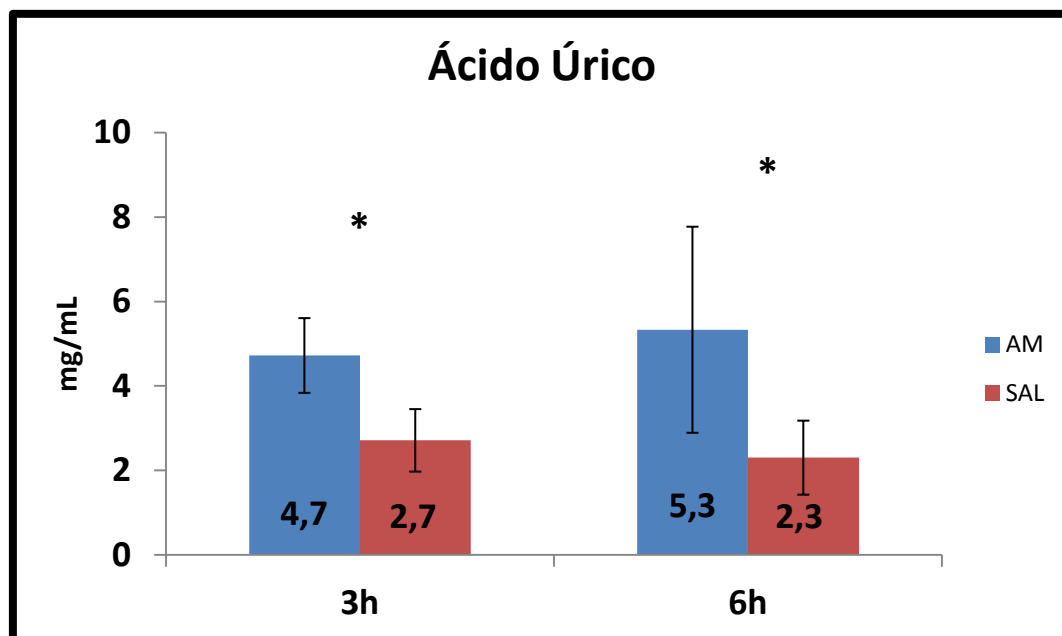


Figura 21 – Dosagem do ácido úrico venoso. Grupos com 3 horas ($p = 0,003$) e 6 horas ($p < 0,001$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina). *: $p < 0,05$

4.5 Análise histopatológica – microscopia óptica

4.5.1 Análise histopatológica – neutrófilos

4.5.1.1 Perivascular

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos AM e SAL no que se refere à contagem de neutrófilos no tecido perivascular em ambos os tempos de isquemia estudados (3 h – AM = $1,4 \pm 1,3$ vs Salina = $3,2 \pm 2,0\%$, $p = 0,193$; 6 h – AM = $2,3 \pm 1,3$ vs Salina = $4,6 \pm 2,0\%$, $p = 0,193$) (Figura 22)

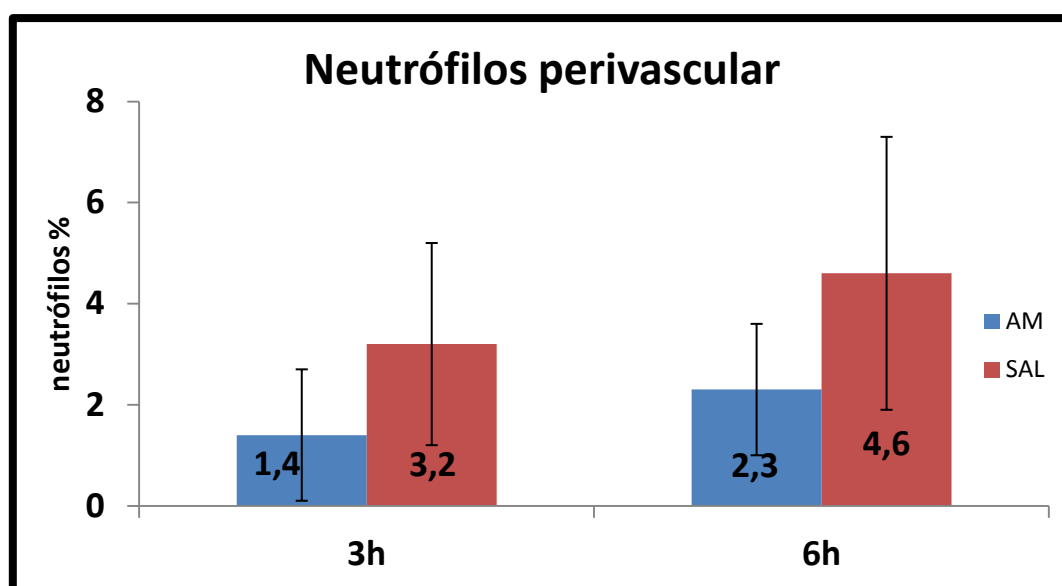


Figura 22 – Contagem de neutrófilos no tecido perivascular em lâminas coradas por hematoxilina e eosina. Grupos com 3 horas ($p = 0,193$) e 6 horas ($p = 0,193$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina)

4.5.1.2 Perialveolar

A contagem de neutrófilos no tecido perialveolar foi maior no grupo SAL em relação ao grupo AM quando comparados os grupos submetidos a 6 horas de isquemia. A mesma diferença não foi observada entre os grupos com isquemia de 3 horas (3 h – AM = $3,0 \pm 2,1$ vs Salina = $4,7 \pm 2,4\%$, $p = 0,135$; 6 h – AM = $2,8 \pm 2,2$ vs Salina = $5,1 \pm 3,1\%$, $p = 0,046$) (Figura 23).

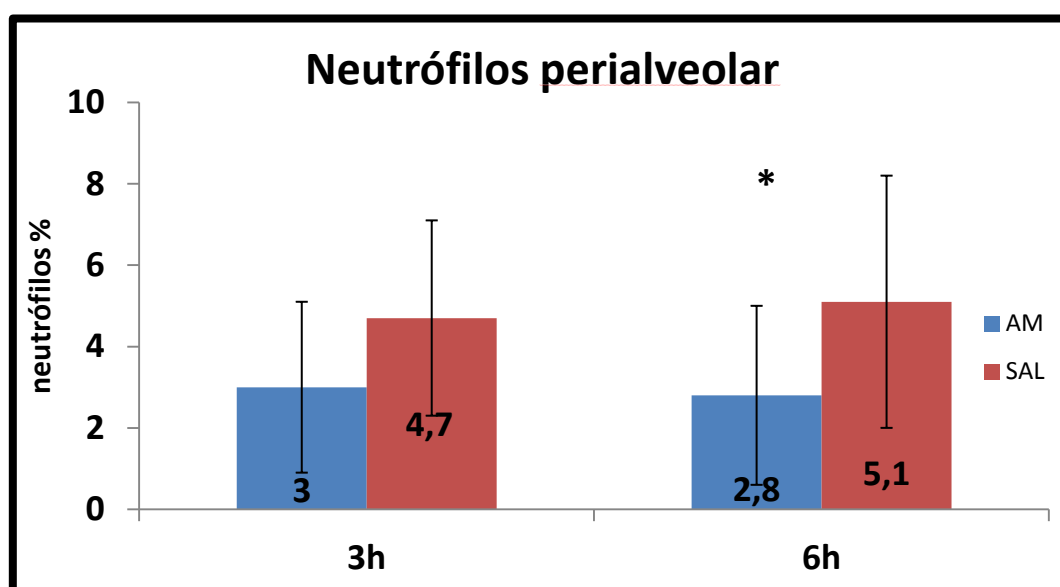


Figura 23 – Contagem de neutrófilos no tecido perialveolar em lâminas coradas por hematoxilina e eosina. Grupos com 3 horas ($p = 0,135$) e 6 horas ($p = 0,046$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina). *: $p < 0,05$

Para os grupos AM e SAL submetidos a 3 horas e 6 horas de isquemia, não houve diferença estatisticamente significativa em relação à contagem de plasmócitos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos nos tecidos perialveolar e perivascular.

4.5.2 Análise histopatológica – edema

4.5.2.1 Perivascular

A quantificação do edema no tecido perivascular foi superior no grupo SAL em comparação ao grupo AM, com significância estatística, quando comparados os grupos submetidos à isquemia de 6 horas. A mesma diferença não foi observada entre os grupos submetidos ao tempo de 3 horas de isquemia (3 h – AM = $34,9 \pm 4,88$ vs Salina = $39,7 \pm 4,79\%$, $p = 0,083$; 6 h – AM = $35,2 \pm 7,65$ vs Salina = $44,8 \pm 6,39\%$, $p = 0,001$) (Figura 24).

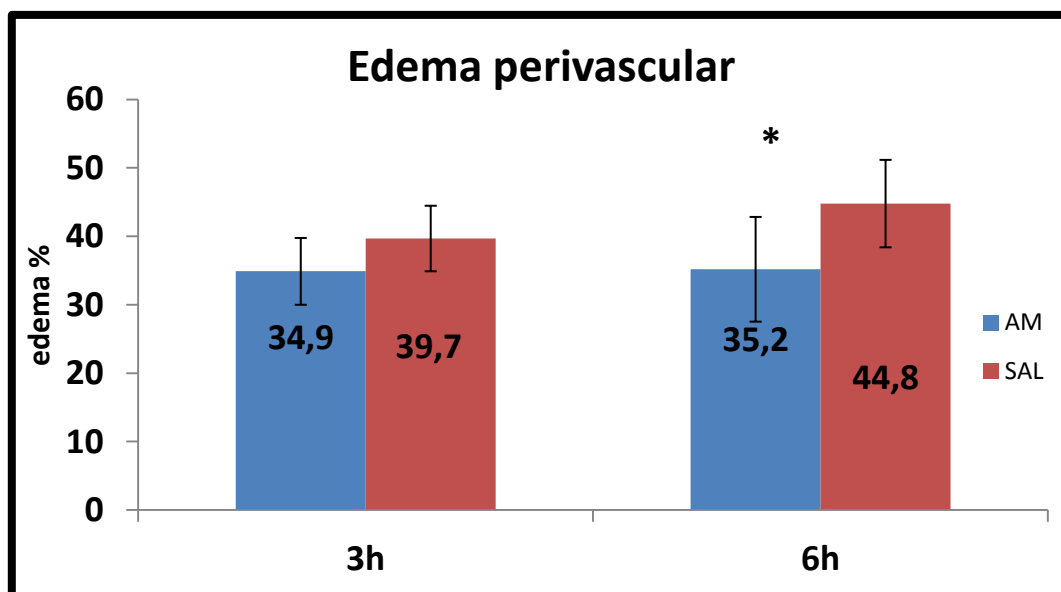


Figura 24 – Quantificação do edema no tecido perivascular em lâminas coradas por hematoxilina e eosina. Grupos com 3 horas ($p = 0,083$) e 6 horas ($p = 0,001$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina). *: $p < 0,05$

4.5.2.2 Perialveolar

A quantificação do edema no tecido perialveolar foi estatisticamente maior no grupo SAL, em comparação ao grupo AM, entre os animais submetidos a 3 horas de isquemia, não havendo diferença entre os grupos submetidos a 6 horas de isquemia (3 h – AM = $18,4 \pm 14,2$ vs Salina = $28,1 \pm 18,2\%$, $p = 0,041$; 6 h – AM = $27,4 \pm 8,4$ vs Salina = $49,6 \pm 33,3\%$, $p = 0,074$) (Figura 25).

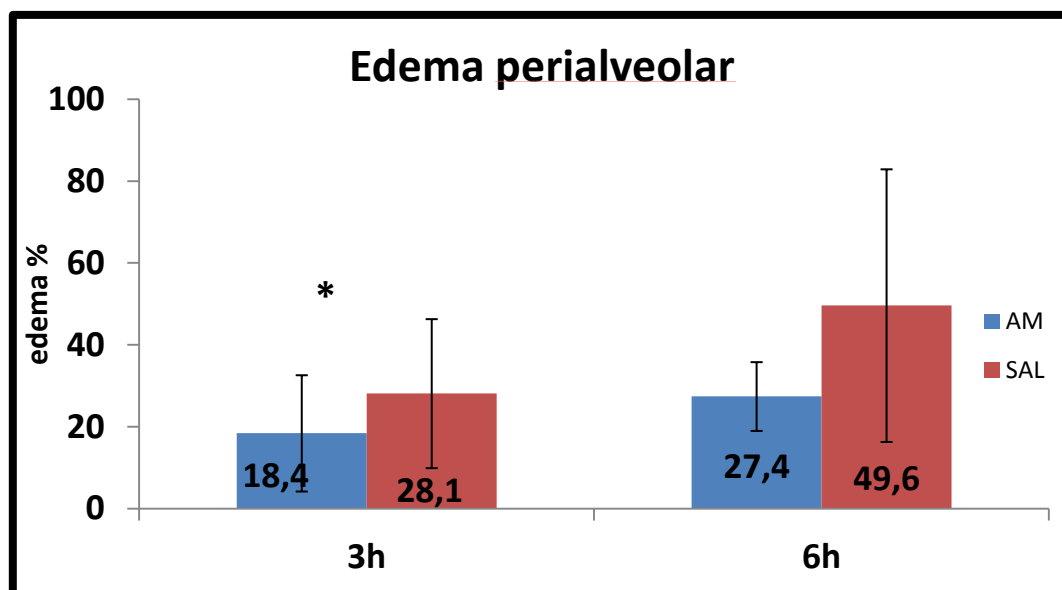


Figura 25 – Quantificação do edema no tecido perialveolar em lâminas coradas por hematoxilina e eosina. Grupos com 3 horas ($p = 0,041$) e 6 horas ($0,074$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina). *: $p < 0,05$

4.5.3 Análise histopatológica – hemorragia

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos AM e SAL na quantificação da hemorragia intra-alveolar, quando comparados os grupos submetidos a 3 horas e 6 horas de isquemia (3 h – AM = $11,9 \pm 5,6$ vs Salina = $20,7 \pm 11,5\%$, $p = 0,39$; 6 h – AM = $15,7 \pm 7,0$ vs Salina = $26,4 \pm 13,0\%$, $p = 0,1$) (Figura 26).

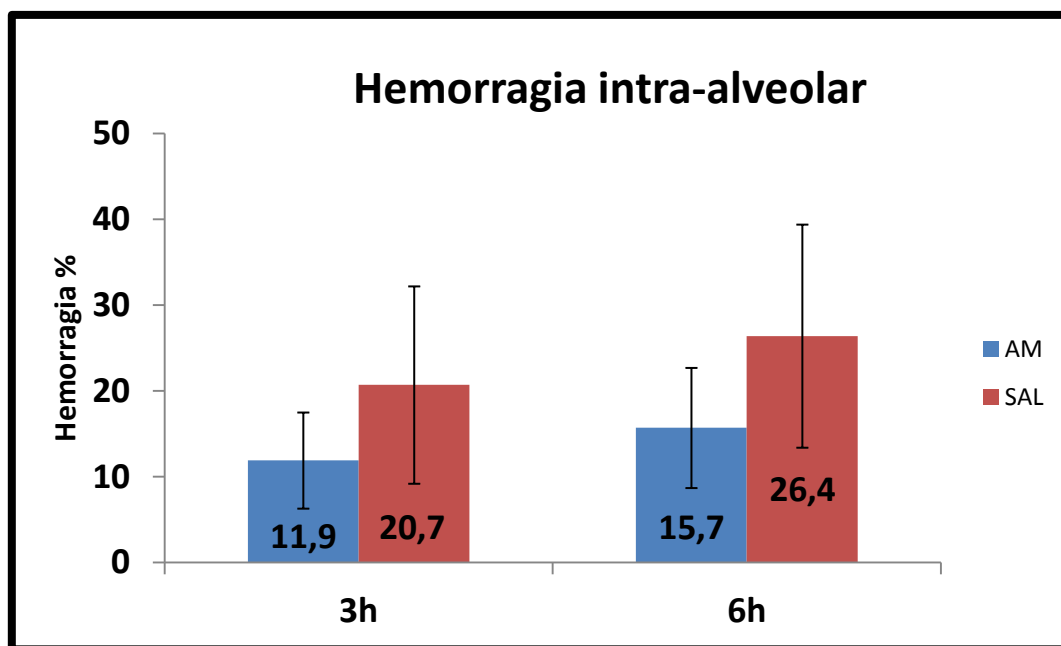


Figura 26 – Quantificação da hemorragia intra-alveolar em lâminas coradas por hematoxilina e eosina. Grupos com 3 horas ($p = 0,39$) e 6 h ($p = 0,1$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina)

4.6 Citocinas

4.6.1 TNF- α

O grupo AM apresentou significativa diminuição nos níveis de TNF- α no LBA quando comparado ao grupo SAL entre os animais submetidos à 6 horas de isquemia. No entanto, não houve diferença entre os grupos de animais submetidos a 3 horas de isquemia (3 h – AM = $257,9 \pm 102,5$ vs Salina = $284,2 \pm 195,6$ pg/mL, $p = 0,710$; 6 h – AM = $189,5 \pm 93,5$ vs Salina = $342,9 \pm 130,4$ pg/mL, $p = 0,007$) (Figura 27).

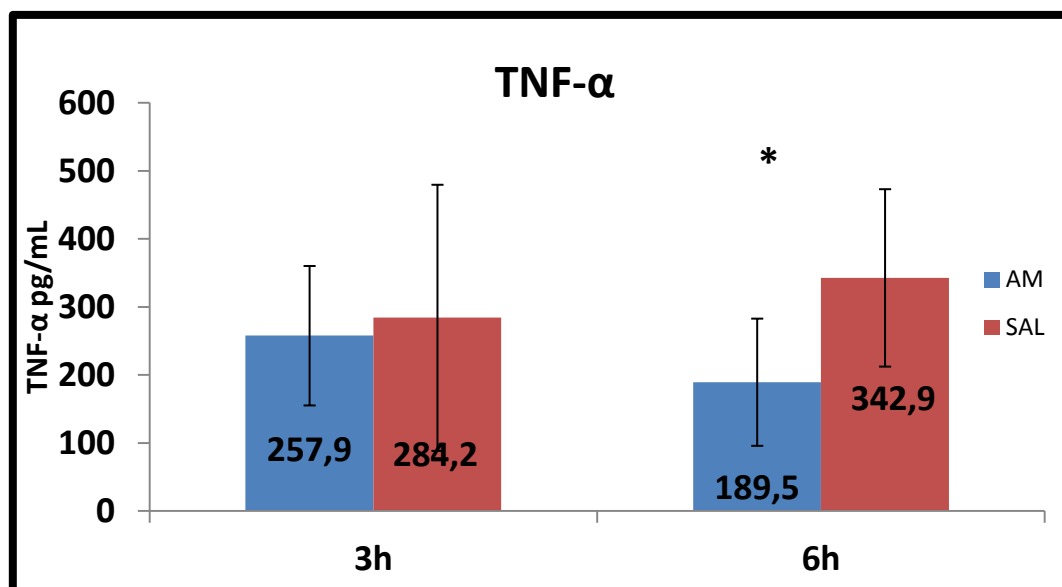


Figura 27 – Quantificação do TNF- α no lavado broncoalveolar. Grupos com 3 horas ($p = 0,710$) e 6 horas ($p = 0,007$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina). *: $p < 0,05$

4.6.1 IL-6

O grupo AM apresentou significativa redução nos níveis de IL-6 quando comparado ao grupo SAL, em ambos os tempos de isquemia (3 h – AM = $122,4 \pm 24,9$ vs Salina = $175,6 \pm 50,3$ pg/mL, $p = 0,008$; 6 h – AM = $142 \pm 38,7$ vs Salina = $351,3 \pm 80,7$ pg/mL, $p = 0,002$) (Figura 28).

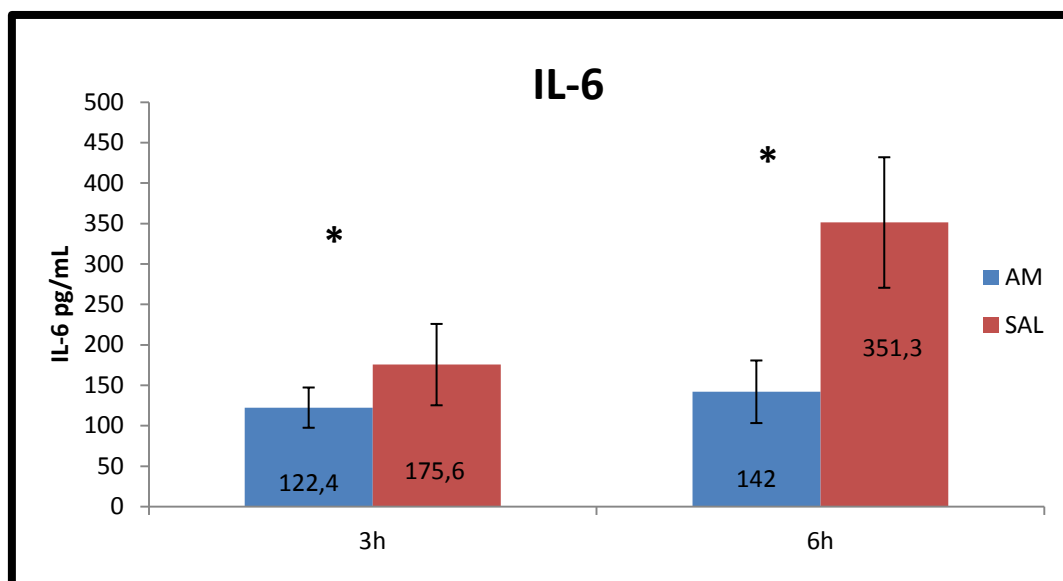


Figura 28 – Quantificação da IL-6 no lavado broncoalveolar. Grupos com 3 horas ($p = 0,008$) e 6 horas ($p = 0,002$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina). *: $p < 0,05$

4.6.2 Cinc-1

A dosagem da citocina Cinc-1 no lavado broncoalveolar dos animais não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos AM e SAL em ambos os tempos de isquemia (3 h – AM = $103,3 \pm 32,6$ vs Salina = $131,9 \pm 32,4$ pg/mL, $p = 0,065$; 6 h – AM = $111,6 \pm 31,8$ vs Salina = $101,6 \pm 38,7$ pg/mL, $p = 0,537$) (Figura 29).

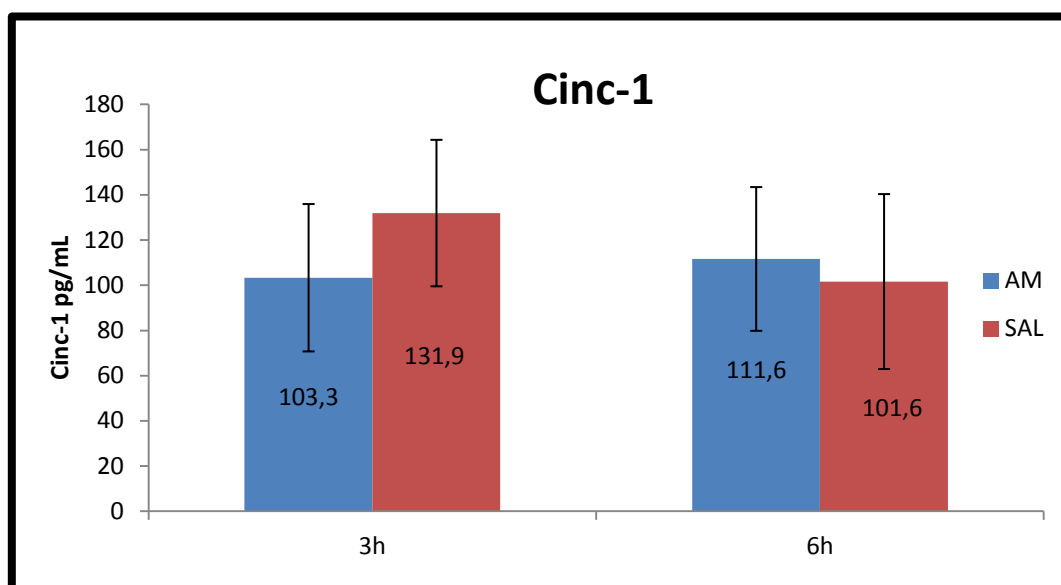


Figura 29 – Quantificação do Cinc-1 no lavado broncoalveolar. Grupos com 3 horas ($p = 0,065$) e 6 horas ($p = 0,537$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina)

4.7 Imunohistoquímica

4.7.1 Caspase 3

Não houve diferença na expressão da Caspase 3 quando comparados os grupos AM e SAL submetidos a 3 horas e 6 horas de isquemia (3 h – AM = $5,7 \pm 1,8$ vs Salina = $6,3 \pm 2,9\%$, $p = 0,574$; 6 h – AM = $5,8 \pm 0,8$ vs Salina = $6,2 \pm 1,0$ pg/mL, $p = 0,764$) (Figura 30).

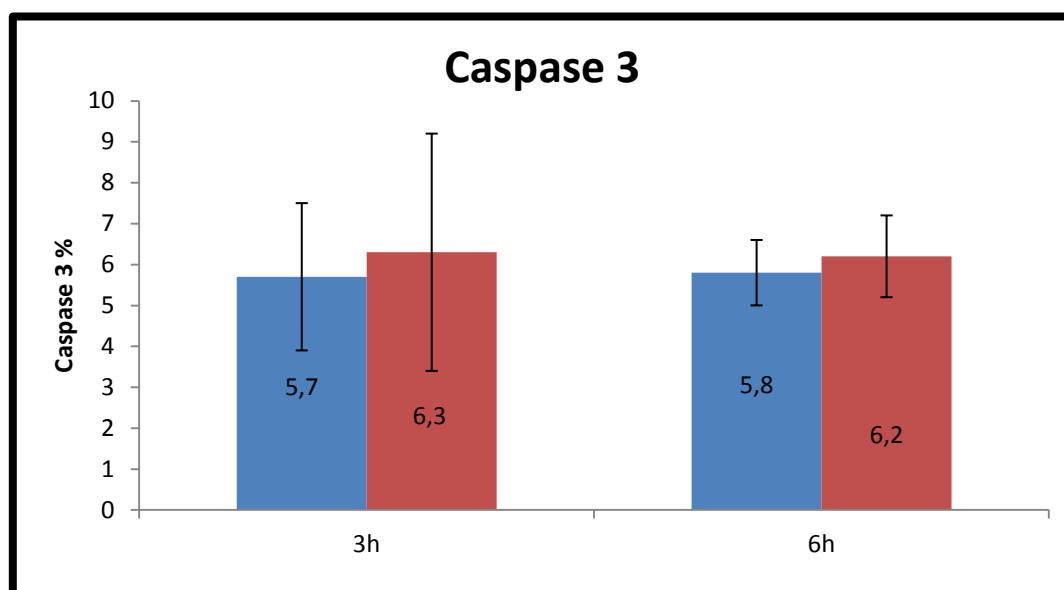


Figura 30 – Quantificação da Caspase 3 por imunohistoquímica. Grupos com 3 horas ($p = 0,574$) e 6 horas ($p = 0,764$) de isquemia (AM: azul de metileno, SAL: salina)

5 DISCUSSÃO

Modelos experimentais, que utilizam o transplante pulmonar ortotópico em pequenos roedores, como ratos e camundongos, são bastante úteis, não só por mimetizarem o transplante em seres humanos, mas também por permitirem a coleta de materiais para análise que se assemelham ao que é realizado em pacientes, como: a avaliação gasométrica, o lavado broncoalveolar e a avaliação histopatológica⁵⁰.

Tecnicamente, o transplante em ratos segue as mesmas etapas das realizadas em seres humanos, com pequenas variações que tornam as cirurgias menos complexas⁵¹. A utilidade científica destes modelos se dá principalmente para o estudo das lesões de IR e DPE, rejeição celular aguda e bronquiolite obliterante⁵⁰.

Desta forma, consideramos que o presente estudo contribui como etapa inicial em uma linha de pesquisa que representa uma importante lacuna científica, podendo apresentar, à posteriori, aplicação em seres humanos.

Greca et al.¹² estudaram os efeitos do AM em ratos submetidos a isquemia intestinal obtida por clampeamento da artéria mesentérica cranial por 1 hora, seguida por um período de 4 horas de reperfusão. Foram analisados os efeitos da isquemia sobre os rins, intestinos e pulmões, por meio de estudo histopatológico, dosagem do ácido úrico e mensuração do edema.

Os autores observaram uma atenuação da lesão pulmonar no grupo experimento, com menor formação de edema intersticial e menor quantidade de células polimorfonucleares, observado pela análise histopatológica. A conclusão do estudo foi que o AM é capaz de atenuar as lesões pulmonares produzidas pelos eventos de IR intestinal. A partir deste trabalho, resolvemos observar os efeitos do AM no processo de IR consequente ao transplante pulmonar de ratos.

A lesão por IR é complexa e de natureza multifatorial, levando a disfunção microcirculatória e dano celular⁵².

O aumento da permeabilidade endotelial capilar na circulação pulmonar gera edema no interstício e alvéolos^{11,14}. Desta maneira, a troca gasosa fica

comprometida, podendo levar a DPE^{13,14,53,54}. Clinicamente, esta entidade é reconhecida quando a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ é inferior a 200 mmHg nas primeiras 72 horas após o implante do enxerto⁷.

Diversos trabalhos utilizaram a medida da PaO_2 ou a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, como forma de avaliar a função pulmonar pós experimentos com IR^{15,52, 55, 56}.

Xu et al.⁵⁵, utilizando um modelo de IR *in situ* em coelhos, perfundiram seletivamente a artéria pulmonar esquerda com solução de preservação LPD nos animais do grupo controle e, adicionaram ulinastatin, um inibidor da produção de ERO, ao grupo experimento.

Avaliações gasométricas foram obtidas em diferentes tempos durante a isquemia e a reperfusão, além de uma medida basal. Os resultados mostraram que, durante a isquemia, não houve queda significativa da PaO_2 , a qual passou a ocorrer depois da reperfusão. Houve tendência a retorno aos níveis basais apenas no grupo experimento, após 90 minutos.

O experimento de Xu et al.⁵⁵ chama a atenção para a importância da repercussão funcional causada pela reperfusão de pulmões isquêmicos, uma vez que o clampeamento da artéria pulmonar esquerda não foi capaz de causar alteração gasométrica, enquanto que a reperfusão levou a queda da PaO_2 .

Desta maneira, consideramos a dosagem da PaO_2 um importante parâmetro funcional a ser avaliado em estudos que envolvam IR pulmonar. Na presente pesquisa, realizamos uma única dosagem da PaO_2 , após 120 minutos de reperfusão dos enxertos, e diferença estatisticamente significativa, com melhor desempenho no grupo AM, foi evidente apenas no grupo submetido à 3 horas de isquemia. O estudo de Xu et al.⁵⁵ mostra uma rápida recuperação funcional dos animais e, medições em tempos mais precoces de reperfusão em nosso estudo, poderiam mostrar diferenças mais pronunciadas em ambos os tempos de isquemia.

Pieróg et al.⁵² conduziram um estudo no qual avaliaram a ação da colchicina, um antiinflamatório e sequestrador de radicais livres, contra a lesão de IR.

Ratos foram divididos em quatro grupos, sendo dois controle e dois experimento, com tempos de isquemia de 12 ou 18 horas, seguido por

reperfusão de 24 horas. Não houve diferença na análise funcional obtida pela medida da PaO_2 entre os grupos.

No experimento de Pieróg et al.⁵², em que os animais foram submetidos a tempos ainda maiores de isquemia do que no presente estudo, os autores também não encontraram diferença entre os grupos. O tempo de reperfusão também foi superior ao que empregamos em nosso trabalho. Estes achados reforçam o fato de que maiores tempos de reperfusão podem permitir a recuperação funcional dos animais, deixando de mostrar diferenças que possam vir a existir em momentos mais precoces da reperfusão.

Quadri et al.⁵⁶ realizaram estudo experimental com transplante pulmonar em ratos com o objetivo de verificar o papel da morte celular programada, mediada pela caspase no processo de lesão de IR.

Os animais foram submetidos a períodos de isquemia fria de 6 ou 18 horas, seguidos por 2 horas de reperfusão. No grupo experimento, foi feito a instilação peritoneal dos inibidores da caspase IDN 6556 ou zVAD-fmk. Os autores realizaram a medida da PaO_2 , não encontrando diferença entre os grupos de animais submetidos à 6 horas de isquemia. No entanto, entre aqueles com 18 horas de isquemia, houve diferença favorável aos animais que receberam os inibidores da caspase. Da mesma forma que, em nosso estudo, animais submetidos a 6 horas de isquemia e 2 horas de reperfusão não apresentaram diferença na análise funcional obtida por meio da dosagem da PaO_2 .

Devemos salientar que, a avaliação da PaO_2 não sofre influência exclusiva da lesão causada pela IR. Animais recém submetidos à toracotomia e exploração cirúrgica da cavidade pleural podem sofrer de fenômenos algícos, hipomotilidade diafragmática, hipoventilação e outros eventos que irão interferir com a análise gasométrica.

Pudemos notar, ainda, no presente estudo, valores da PaO_2 , maiores no grupo salina em animais submetidos à 6 horas de isquemia quando comparados ao grupo com 3 horas de isquemia. Este fato, aliado ao anteriormente exposto, mesmo não tendo alcançado significância estatística, reforça a importância de medidas mais precoces e seriadas da PaO_2 , permitindo a construção de uma curva de valores que possa representar uma

tendência mais fidedigna do comportamento dos valores gasométricos em estudos de reperfusão pulmonar.

Por fim, deve-se ressaltar que o sangue arterial colhido para análise gasométrica no presente estudo, foi proveniente da aorta abdominal, sem exclusão do pulmão nativo, o que pode interferir na análise dos resultados. Desta forma, consideramos que estudos que tenham por objetivo avaliar a oxigenação promovida por enxertos devam ser realizados por coleta de amostras que tenham realizado troca gasosa exclusivamente no pulmão transplantado.

O NO possui ação broncodilatadora e vasodilatadora pulmonar, sendo empregado como droga terapêutica em diversas situações, incluindo o transplante pulmonar^{26,27,28}. Porém, em altas concentrações, induz hiperemia, exsudação plasmática, secreção de muco e proliferação de linfócitos, caracterizando inflamação⁵⁷.

No transplante pulmonar, a dosagem do óxido nítrico exalado é um excelente marcador de inflamação na via aérea⁵⁷.

Em nosso estudo, realizamos a dosagem inicial do NOex logo que os animais receptores foram intubados e a ventilação mecânica instalada. Um filtro foi conectado a saída expiratória do ventilador mecânico, com o objetivo de impedir que variações na concentração atmosférica do NO pudessem interferir nas dosagens. Não houve diferença entre os grupos no que se refere a esta medida, o que mostra a homogeneidade da amostra.

Nova dosagem foi realizada, após o período de reperfusão, imediatamente antes da eutanásia. Os animais do grupo experimento submetidos à isquemia de 3 horas apresentaram níveis significativamente menores que os do grupo controle (grupo SAL). A mesma diferença não foi percebida para os animais submetidos à isquemia de 6 horas.

Estes resultados são compatíveis com um menor grau de inflamação das vias aéreas nos animais do grupo experimento submetidos a curto tempo de isquemia. Embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos à isquemia de 6 horas, pudemos notar que os animais do grupo AM apresentaram valores de NOex finais inferiores aos

iniciais, enquanto que, no grupo salina, a dosagem final do NOex foi maior do que a inicial.

A ação do AM sobre o óxido nítrico acontece quando ocorre a produção da isoforma indutível do mesmo, mediada pelo processo inflamatório causado pela lesão de IR, quando o AM impede a ação segundo mensageiro cGMP^{20,22}.

Não podemos descartar a hipótese de que o AM só tenha sido capaz de bloquear o excesso de produção de NOex em animais submetidos a curto tempo de isquemia, em que o processo inflamatório e o estresse oxidativo tendem a ser menores do que naqueles casos com maiores períodos. Porém, estudos adicionais são necessários para que se possa responder a essa hipótese. Podemos ainda, ao considerar os demais resultados apresentados neste estudo, perceber que o AM mostrou-se eficaz na diminuição do infiltrado inflamatório nos pulmões de animais submetidos à 6 horas de isquemia em relação ao grupo controle, o que torna ainda mais fraca a hipótese de proteção exclusiva a grupos com curto tempo isquêmico.

A lesão de IR pós transplante pulmonar é caracterizada por um aumento na permeabilidade microvascular e pelo sequestro pulmonar de neutrófilos. A reperfusão de pulmões isquêmicos leva a uma maior adesão destas células ao endotélio e, ainda, ao dano pulmonar mediado por polimorfonucleares⁸.

O lavado broncoalveolar é utilizado para analisar o influxo de células inflamatórias para as vias aéreas de pulmões transplantados em seres humanos⁵⁸ e em estudos com roedores^{59,60}. O perfil celular identificado desta maneira é bastante semelhante ao infiltrado celular encontrado em avaliações histopatológicas⁶¹, conforme os resultados apresentados no presente estudo.

Hamacher et al.¹⁵, utilizaram o lavado broncoalveolar em ratos submetidos a transplante pulmonar unilateral esquerdo como forma de avaliar a lesão causada pelo processo de IR. Da mesma forma que em nosso estudo, os autores identificaram uma menor contagem global de células no lavado broncoalveolar do grupo experimento, sem significância estatística, porém, uma significativa redução no total de polimorfonucleares no grupo que sofreu tratamento com o ebselen, em relação ao controle.

Marqui et al.⁶² reafirmam a importância da sequestração neutrofílica e sua migração para os pulmões na gênese da lesão pulmonar aguda, considerando, ainda, que a lesão de IR é dependente dos neutrófilos.

Os autores estudaram um modelo de lesão de IR intestinal em ratos e verificaram o papel protetor do pré tratamento com pentoxifilina contra as lesões pulmonares. Foram avaliados os níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar, a atividade da mieloperoxidase, o infiltrado inflamatório em lâminas preparadas com hematoxilina e eosina e o edema pulmonar, encontrando melhores resultados nos grupos que receberam a droga.

Os autores consideram o endotélio vascular pulmonar uma importante barreira protetora contra a migração de líquidos e células para o interstício, e que a permeabilidade vascular aumentada é consequente a produção das ERO, citocinas, quimiocinas e ativação do complemento. No presente estudo, também avaliamos a dosagem do TNF- α no lavado broncoalveolar e evidenciamos menores níveis no grupo AM quando comparamos os animais submetidos à 6 horas de isquemia.

O TNF- α , em modelos animais, atua como mediador da lesão pulmonar aguda e da indução de edema¹⁵. Os achados do nosso estudo, de redução nos níveis de TNF- α correlacionam-se ao menor infiltrado inflamatório identificado no lavado broncoalveolar, assim como os achados da análise histopatológica no que se refere à inflamação e ao edema.

Ribeiro et al.²⁹ relataram a influência do AM sobre o TNF- α , levando a diminuição de seus níveis, da mesma forma que em nosso estudo, em experimento relacionado a resposta inflamatória sistêmica em pós operatório de cirurgia cardiovascular com a utilização de circulação extra corpórea.

Sotoudeh et al.⁶³ estudaram um modelo experimental onde a N-acetilcisteína foi utilizada para a prevenção da lesão pulmonar induzida por IR em músculo esquelético. O experimento foi realizado a partir do clampeamento da artéria femoral por 2 horas, seguido por 24 horas de reperfusão. A análise histopatológica dos pulmões esquerdos foi realizada verificando maior edema, hemorragia alveolar e infiltração neutrofílica nos animais do grupo controle. Os autores ressaltaram o papel da ativação neutrofílica mediada por metabólitos gerados por tecidos isquêmicos na origem das lesões.

Em nosso estudo, também pudemos observar maior edema e infiltração neutrofílica em animais do grupo controle, porém, não houve diminuição na formação da hemorragia intra-alveolar no grupo tratado com AM. Isto possivelmente se deve ao fato de que em nosso modelo, por se tratar de transplante pulmonar, há manipulação do pulmão e sangramento secundário a trauma.

Castro et al.⁶⁴ conduziram um estudo experimental com indução de isquemia e reperfusão hepática em coelhos e a função protetora da N-acetilcisteína contra as lesões remotas pulmonares. A isquemia foi obtida por meio do clampeamento do hilo hepático por 30 minutos, seguido de reperfusão por 24 ou 48 horas. Fragmentos pulmonares foram submetidos a estudo histopatológico e imunohistoquímico, este último, com o objetivo de mensurar a expressão da caspase 3, como forma de quantificar a morte celular por apoptose.

Os resultados foram favoráveis aos grupos experimento, com menor infiltração neutrofílica e por macrófagos, menos edema e expressão de apoptose. Os autores discutem o papel da membrana celular alvéolo capilar na manutenção da função pulmonar e suas alterações consequentes a geração de ERO nos processos de IR.

Em nosso estudo, não pudemos observar diferença na quantificação de macrófagos no lavado broncoalveolar ou nas peças submetidas ao estudo histopatológico. Também utilizamos a caspase 3 como método para determinação da morte celular induzida por apoptose e não verificamos diferença entre os grupos.

Uma vez que a apoptose é considerada um evento precoce na reperfusão de pulmões transplantados e sua ocorrência correlacionada à piora funcional dos enxertos⁵⁶, esperávamos menor expressão nos animais que receberam o AM. Tal fato, pode ser explicado pelo aparente paradoxal efeito das espécies reativas de nitrogênio na morte celular programada, podendo exercer efeitos pró e anti-apoptóticos^{44,45,46}.

Ao mesmo tempo que o peroxinitrito age na mitocôndria ativando proteases que favorecem a conversão da procaspase-3 em caspase 3, o cGMP impede este mecanismo^{44,45,46}. Uma vez que o AM é inibidor da ação do cGMP,

a ocorrência da apoptose não é impedida, culminando com a observação de semelhança entre os grupos no presente estudo.

Sugimoto et al.⁶⁵ realizaram um estudo experimental com o objetivo de verificar os efeitos da biliverdina, um inibidor da formação de ERO, no processo de IR consequente ao transplante pulmonar de ratos. Na dose de 10 μ M, a droga levou a uma menor infiltração neutrofílica e a menor expressão de mediadores inflamatórios como o TNF- α , as interleucinas 6 e 8 e a fração indutível da óxido nítrico sintase. No presente estudo, a dosagem de IL-6 esteve diminuída no grupo que utilizou o AM em ambos os tempos de isquemia. Como esta interleucina participa de processos inflamatórios modulando a proliferação celular, o seu bloqueio causado pela utilização do AM é compatível com a menor resposta inflamatória na presente pesquisa, o qual foi demonstrado com a diminuição de neutrófilos no LBA e no parênquima pulmonar.

No que se refere aos níveis da Cinc-1, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos aos tempos de isquemia de 3 horas e 6 horas. Este resultado é inesperado, uma vez que se trata de uma quimiocina responsável pela atividade quimiotática de neutrófilos, indução de moléculas de adesão e ativação da função neutrofílica⁴³. Uma possível explicação para a ausência de diferença no grupo com 3 horas de isquemia pode ser o número de animais submetidos ao experimento, uma vez que os resultados apontam para uma tendência a menores valores no grupo AM.

Ohsumi et al.⁶⁶ avaliaram o efeito protetor do surfactante inalado em modelo de transplante pulmonar canino pós parada cardíaca. Os animais do grupo experimento apresentaram melhor oxigenação, menores níveis de interleucina 8, TNF- α e menor quantidade de proteínas no lavado broncoalveolar. A análise histopatológica evidenciou menos edema, hemorragia e menor sequestração neutrofílica. Estes resultados foram semelhantes aos que observamos em nosso estudo.

Eppinger et al.⁶⁷, a partir de estudo conduzido com modelo experimental de isquemia e reperfusão de pulmões esquerdos de ratos, propuseram um modelo bifásico de lesão, com picos em 30 minutos e 4 horas, sendo a fase

precoce, determinada em sua maior parte pela ação de macrófagos pulmonares ativados, e, a tardia, dependente de neutrófilos.

Em nosso estudo, o predomínio celular foi de neutrófilos e macrófagos, sendo que os animais do grupo AM apresentaram menor infiltração neutrofílica tanto no lavado broncoaveolar, quanto na análise histopatológica.

Os achados foram estatisticamente significativos para os grupos submetidos à 6 horas de isquemia no que se refere à análise do material obtido por meio da análise do infiltrado intersticial e do lavado broncoalveolar. Para os grupos submetidos a 3 horas de isquemia, a mesma significância não foi identificada, porém, parece haver uma tendência a melhores resultados no grupo AM.

Tal achado pode ser justificado pelo padrão bimodal de resposta celular mostrado em estudo prévio⁶⁷, já que o tempo de reperfusão, ao qual os animais do presente experimento foram submetidos (2 horas), encontra-se entre os picos de ação das respostas mediadas por macrófagos e neutrófilos.

O grau de edema pulmonar é inversamente proporcional à qualidade da preservação dos pulmões⁶⁸.

Diversos modelos experimentais utilizaram a mensuração do edema como forma de avaliar a eficácia de drogas protetoras contra a lesão de IR pós-transplante pulmonar^{69,70,71,72}.

No presente estudo, optamos por realizar a mensuração do edema por meio da análise das lâminas coradas pela hematoxilina eosina e observadas com o microscópio óptico. Desta maneira, os resultados obtidos refletem a porcentagem da superfície da lâmina composta por edema.

O grau de edema encontrado em nosso estudo foi significativamente diminuído no tecido perivascular do grupo de animais submetidos a 6 horas de isquemia e no tecido perialveolar do grupo de animais submetidos a 3 horas de isquemia pela utilização do AM. Ainda que nos demais grupos não houvesse diferença com significância estatística, pudemos notar menor formação de edema nos grupos AM.

A dosagem do ácido úrico como método para quantificação indireta da ação da enzima xantina oxidase foi proposta por Greca et al.¹².

Kelner et al.⁷³ propuseram o potencial do AM como bloqueador da produção de ERO no processo de IR e, consideraram, no processo bioquímico desta interação, que o AM acelera a conversão da hipoxantina para ácido úrico.

Den Hengst et al.¹¹, da mesma forma, consideram o AM uma droga que favorece a formação do ácido úrico, a partir da inibição da enzima xantina oxidase, atuando na degradação da hipoxantina.

Desta maneira, percebemos que o ácido úrico será formado em situações em que haja isquemia com formação de hipoxantina, sendo um marcador de atividade inflamatória. Por outro lado, uma vez que sua formação é acelerada a partir da inibição da ação da enzima xantina oxidase, fundamental na geração de ERO, concluímos que níveis séricos maiores estarão presentes quando houver o bloqueio da formação destas, caracterizando um mecanismo molecular benéfico no contexto das lesões por IR, como no presente estudo.

Em nosso estudo, os níveis séricos de ácido úrico estiveram significativamente aumentados nos grupos AM em comparação aos grupos salina nos tempos de isquemia de 3 horas e 6 horas. Consideramos este achado satisfatório, conforme exposto anteriormente.

Santos et al.⁷⁴ demonstraram a reação entre o urato e o radical peroxinitrito levando a formação de alantoína, aloxano e radical aminocarbonil. Além disso, sugerem que o urato reaja com o ácido peroxinitroso e com os radicais gerados a partir de sua decomposição, formando produtos capazes de interagir com o ânion peroxinitrito, explicando, desta forma, o potencial do urato em inibir reações mediadas pelo peroxinitrito. Nos pulmões, o peroxinitrito formado a partir do NO é tóxico e participa do processo da lesão de IR²⁹.

Assim, constatamos que o AM não só atua na inibição direta da ação do cGMP como também na interação que o NO apresenta com ERO, levando a formação do peroxinitrito, o que reforça os achados encontrados em nosso estudo, no qual consideramos que a presença do ácido úrico se traduz em proteção contra os eventos de IR consequentes ao transplante pulmonar.

Becker et al.⁷⁵ realizaram um estudo com corações de porcos, com o objetivo de avaliar a interação do ácido úrico com radicais livres e seu possível papel protetor. A partir da adição de DMSO ao perfusato Krebs-Henseleit Buffer, a liberação endógena de ácido úrico a partir do endotélio microvascular

coronariano foi estimulada e o seguinte efeito observado: a dilatação coronariana mediada pela acetilcolina e pela adenosina foi inibida com o uso do alopurinol, um inibidor da formação do ácido úrico. Quando houve aplicação exógena do ácido úrico, os efeitos da acetilcolina sobre o coração aumentaram, levando ao melhor desempenho miocárdico.

Becker⁷⁶ reafirmou a capacidade antioxidante do ácido úrico por meio de reação com os radicais hidroxila e ácido hipocloroso, produzindo metabólitos inócuos. Relata, ainda, o papel do urato como cossubstrato da enzima ciclooxigenase A. Os autores consideram que o urato tem ação protetora contra as lesões de reperfusão induzidas por granulócitos ativados.

Andranovich et al.⁷⁷ estudaram possíveis interações *in vitro* e *in vivo* entre o AM e o ácido úrico, chegando a conclusão que, na presença de oxigênio, ocorre uma reação de oxidação, levando a um prejuízo na dosagem deste último, tornando necessário o imediato processamento do material para que não haja interferência na leitura e quantificação do ácido úrico.

O presente modelo de avaliação das lesões de IR em transplante pulmonar experimental em ratos se mostrou satisfatório no que se refere aos tempos escolhido para isquemia e reperfusão dos enxertos.

Os efeitos da reperfusão acontecem precocemente, conforme estudo prévio⁷⁸. Longos períodos de reperfusão podem, inclusive, levar a uma substituição do padrão de morte celular, onde os eventos apoptóticos passam a dar lugar a necrose⁷⁸.

Desta forma, julgamos desnecessária a utilização de modelos com tempos excessivamente longos de isquemia e reperfusão.

Algumas críticas podem ser feitas ao modelo deste estudo. A monitorização de parâmetros hemodinâmicos, marcadores de perfusão tissular e parâmetros ventilatórios poderiam ser úteis para o melhor entendimento da ação do AM. Futuros trabalhos dentro desta linha de pesquisa deverão suprir esta necessidade.

Uma questão que deverá ser observada em futuros estudos que envolvam a ação do AM em pulmões transplantados é a possibilidade de aumento da pressão vascular pulmonar devido a inibição da ação do cGMP.

Não avaliamos a ocorrência deste evento na presente pesquisa, porém, caso positivo, não influenciou os resultados satisfatórios obtidos com o uso da droga.

A administração peritoneal da droga requer preservação da microcirculação para sua adequada absorção, que pode sofrer variação entre os animais. Minimizamos a ocorrência deste viés, utilizando animais saudáveis, jovens e com peso controlado. O AM, por sua inibição ao cGMP, poderia alterar o *status* microcirculatório. Para evitar esta ocorrência, optamos por fazer sua instilação logo após a intubação dos animais receptores, aproximadamente 60 minutos antes do início da reperusão dos enxertos, momento em que ainda não há a ação deletéria do NO por meio da ativação do cGMP e, portanto, quando o AM não interfere com a microcirculação. A via de administração peritoneal é mais simples do que a endovenosa e, em nossa opinião, satisfatória para a realização do presente estudo.

Outra questão referente ao modelo deste estudo é a dose de AM utilizada. Optamos por empregar uma mesma dose em todos os procedimentos cirúrgicos (aproximadamente 50 mg/Kg) conforme realizado em estudo prévio¹², em que a mesma se mostrou eficaz na proteção dos pulmões contra os efeitos deletérios da IR intestinal.

Weinbroum⁷⁹ relatou, em seu estudo, o efeito dose dependente do AM, dito efeito em “sino”, no qual existe um intervalo de dose “ideal” e, doses acima ou abaixo deste intervalo, poderiam levar a ausência de efeitos protetores.

Este estudo foi realizado a partir de um modelo em ratos submetidos a IR pancreática e as doses testadas foram 42, 68 e 128 μ M de AM endovenoso. Os autores consideram que, em altas doses, o excessivo efeito bloqueador contra a guanilatociclase, com consequente inibição do NO, possa se tornar desvantajosa para a integridade da membrana alvéolo capilar, superando os efeitos protetores do AM.

De acordo com o autor, a ausência de efeitos protetores relacionada às doses de 42 e 128 μ M ainda poderia estar associada a uma perda de função mediada pela hipóxia⁷⁹.

Sabemos que o AM possui importante efeito nos fenômenos vasoplégicos, como os que ocorrem em consequência das lesões de IR. Apesar da importância do combate a vasoplegia, com a tentativa de

restauração do tônus vascular, doses “acima da ideal” podem levar a uma piora da perfusão tissular, gerando um aumento do metabolismo anaeróbico e estados acidóticos. Desta maneira, consideramos também que estudos que envolvam a análise da microcirculação possam ser esclarecedores em relação ao efeito dose dependente do AM. Consideramos, ainda, que novos estudos avaliando o efeito dose-resposta do AM, em modelos semelhantes ao utilizado neste, possam direcionar para o intervalo de dose “ideal” a ser utilizado.

Meirelles Jr et al.⁸⁰ conduziram estudo experimental em porcos nos quais foi induzido a pancreatite aguda por meio da administração da taurocolato enteroquinase. Os autores identificaram uma melhora nos parâmetros hemodinâmicos dos animais que receberam AM, porém, houve um aumento na lipoperoxidação dos mesmos.

Os autores consideram como mecanismo fisiopatológico, que o bloqueio do NO causado pelo AM levou a melhora dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos, embora, em nível celular, possa haver pior perfusão tissular devido à vasoconstrição. Além disso, o AM pode levar ao aumento da atividade plaquetária em condições de hipovolemia e hemoconcentração, propiciando a lipoperoxidação e o agravamento na perfusão tissular.

Diversas drogas já foram testadas no intuito de prevenir ou minimizar as repercussões da lesão de IR no transplante pulmonar. No entanto, do ponto de vista clínico, a DPE ainda apresenta grande incidência. Em estudo realizado pelo grupo de transplante pulmonar do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 19,8% dos 118 pacientes operados entre 2003 e 2010 desenvolveram DPE em um período de até 48h de pós operatório⁸¹.

A fisiopatologia complexa deste evento associado à inexistência de uma droga capaz de atingir os objetivos acima nos faz acreditar que modelos experimentais que utilizem mais de uma substância com mecanismos de ação diferentes contra o processo de IR devam ser testados, com maior chance de sucesso.

Portanto, o presente estudo demonstra, pela primeira vez, que o AM possui ação benéfica contra os eventos causados pela lesão de IR em

transplante pulmonar experimental de ratos, porém, estudos adicionais são necessários para o melhor entendimento deste mecanismo.

6 CONCLUSÕES

O azul de metileno demonstrou ser droga inibidora da formação da lesão de isquemia e reperfusão, consequente ao transplante pulmonar em ratos.

Em ratos submetidos a transplante pulmonar, o azul de metileno foi eficaz:

- Na atenuação da resposta inflamatória, por reduzir a formação do infiltrado neutrofílico no lavado broncoalveolar e na avaliação histopatológica (animais com 6 horas de isquemia), reduzir o óxido nítrico exalado (animais com 3 horas de isquemia), diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e elevar os níveis de ácido úrico (animais com 3 horas e 6 horas de isquemia).
- Em diminuir a formação de edema, com menores níveis no tecido perialveolar dos animais submetidos a 3 horas de isquemia e no tecido perivascular dos animais submetidos a 6 horas de isquemia.
- No entanto, não mostrou eficácia na prevenção da formação da hemorragia alveolar e na redução da apoptose, verificado pela inexistência de diferença na expressão da caspase 3 entre os grupos.

7 ANEXO

Protocolo n. 3387/09/138

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SDC 3387/09/138

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/02/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1364/09**, intitulado: "**O PAPEL DO AZUL DE METILENO NA PREVENÇÃO DA LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM TRANSPLANTE PULMONAR DE RATOS: ESTUDO EXPERIMENTAL**", apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. FÁBIO BISCEGLI JATENE**

Pesquisador (a) Executante: **MARCUS DA MATTA ABREU**

CAPPesq, 11 de fevereiro de 2010

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO

12/02/10

Elaine

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
matc

8 REFERÊNCIAS

1. Botter M, Saad Jr R. Transplante pulmonar: o estado da arte. In: Saad Jr R, Carvalho WR, Ximenes Netto M, Forte V. *Cirurgia torácica geral*. São Paulo: Atheneu; 2005. p.499-530.
2. Jatene FB, Pego-Fernandes PM. Desafios do transplante pulmonar. [editorial]. *J Bras Pneumol*. 2008;34(5):249-50.
3. Camargo JJ, Schio SM, Sanches L. Transplante de pulmão: conceitos e rotinas. In: Camargo JJ, Pinto Filho DR. *Tópicos de atualização em cirurgia torácica*. São Paulo: FMO; 2011. p.394-401.
4. Registro Brasileiro de Transplantes. 2011 jan.-dez.;17(4) [citado 10 nov. 2012]. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2011/RBT-2011-ANUAL-PARCIAL.pdf>.
5. Samano MN, Minamoto H, Oliveira EQ, Caramori ML, Pêgo-Fernandes PM, Jatene FB. Bronchial stenosis treatment after lung transplantation with a self-expandable silicone stent. *Clinics (São Paulo)*. 2007 Oct;62(5):643-4.
6. Jatene FB, Samano MN, Hueb AC. Perspectivas da cirurgia torácica: tromboendarterectomia pulmonar, cirurgia redutora dos pulmões e transplante de pulmão. In: Andrade Filho LO. *Cirurgia torácica: diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: Cultura médica; 2007. p.510-50.
7. Varela de Ugarte A. Primary graft failure following lung transplantation: is there hope for improvement? *Arch Bronconeumol*. 2005 Sep;41(9):473-4.
8. Reignier J, Sellak H, Lemoine R, Lubineau A, Mazmanian GM, Detruit H, Chapelier A, Hervé P. Prevention of ischemia-reperfusion lung injury by sulfated Lewis(a) pentasaccharide. The Paris-Sud University Lung Transplantation Group. *J Appl Physiol*. 1997 Apr;82(4):1058-63.

9. Bittner HB, Richter M, Kuntze T, Rahmel A, Dahlberg P, Hertz M, Mohr FW. Aprotinin decreases reperfusion injury and allograft dysfunction in clinical lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006 Feb;29(2):210-5.
10. Li Y, Köster T, Mörike C, v Hörsten S, Martin U, Bader M, Haverich A, Simon AR. Pravastatin prolongs graft survival in an allogeneic rat model of orthotopic single lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006 Sep;30(3):515-24.
11. den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Nov;299(5):H1283-99.
12. Greca FH, Gonçalves NM, Souza Filho ZA, Noronha Ld, Silva RF, Rubin MR. The protective effect of methylene blue in lungs, small bowel and kidney after intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras*. 2008 Mar-Apr;23(2):149-56.
13. Della Rocca G, Pierconti F, Costa MG, Coccia C, Pompei L, Rocco M, Venuta F, Pietropaoli P. Severe reperfusion lung injury after double lung transplantation. *Crit Care*. 2002 Jun;6(3):240-4.
14. Korom S, Hillinger S, Cardell M, Zhai W, Tan Q, Dutly A, Leskosek B, Weder W. Sildenafil extends survival and graft function in a large animal lung transplantation model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006 Mar;29(3):288-93.
15. Hamacher J, Stammberger U, Weber E, Lucas R, Wendel A. Ebselen improves ischemia-reperfusion injury after rat lung transplantation. *Lung*. 2009 Mar-Apr;187(2):98-103.
16. İlhan H, Alatas O, Tokar B, Çolak O, Paşaoğlu O, Koku N. Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody, allopurinol, and methylene blue on intestinal reperfusion injury. *J Pediatr Surg*. 2003 Nov;38(11):1591-5.

17. van der Kaaij NP, Kluin J, Haitsma JJ, den Bakker MA, Lambrecht BN, Lachmann B, de Bruin RW, Bogers AJ. Surfactant pretreatment decreases long-term damage after ischemia-reperfusion injury of the lung. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009 Feb;35(2):304-12; discussion 312.
18. Shanmugam G. Vasoplegic syndrome – the role of methylene blue. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005 Nov;28(5):705-10.
19. Dewachter P, Mouton-Faivre C, Tréchet P, Lléu JC, Mertes PM. Severe anaphylactic shock with methylene blue instillation. *Anesth Analg*. 2005 Jul;101(1):149-50, table of contents.
20. Ginimuge PR, Jyothi SD. Methylene blue: revisited. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2010 Oct;26(4):517-20.
21. Paciullo CA, McMahon Horner D, Hatton KW, Flynn JD. Methylene blue for the treatment of septic shock. *Pharmacotherapy*. 2010 Jul;30(7):702-15.
22. Leite EG, Ronald A, Rodrigues AJ, Evora PR. Is methylene blue of benefit in treating adult patients who develop catecholamine-resistant vasoplegic syndrome during cardiac surgery? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2006 Dec;5(6):774-8.
23. Martijn C, Wiklund L. Effect of methylene blue on the genomic response to reperfusion injury induced by cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in porcine brain. *BMC Med Genomics*. 2010 Jul 1;3:27.
24. Friedrich M, Bräuer A, Tirilomis T, Lotfi S, Mielck F, Busch T. Methylene blue administration in severe systemic inflammatory response syndrome (SIRS) after thoracic surgery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2002 Oct;8(5):306-10.
25. Koelzow H, Gedney JA, Baumann J, Snook NJ, Bellamy MC. The effect of methylene blue on the hemodynamic changes during ischemia reperfusion injury in orthotopic liver transplantation. *Anesth Analg*. 2002 Apr;94(4):824-9, table of contents.

26. Perrin G, Roch A, Michelet P, Reynaud-Gaubert M, Thomas P, Doddoli C, Auffray JP. Inhaled nitric oxide does not prevent pulmonary edema after lung transplantation measured by lung water content: a randomized clinical study. *Chest*. 2006 Apr;129(4):1024-30.
27. Murakami S, Bacha EA, Mazmanian GM, Détruit H, Chapelier A, Darteville P, Hervé P. Effects of various timings and concentrations of inhaled nitric oxide in lung ischemia-reperfusion. The Paris-Sud University Lung Transplantation Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Aug;156(2 Pt 1):454-8.
28. Tavare AN, Tsakok T. Does prophylactic inhaled nitric oxide reduce morbidity and mortality after lung transplantation? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2011 Nov;13(5):516-20.
29. Ribeiro NAM. *Variáveis hemodinâmicas, gasométricas e imunocelulares em pacientes submetidos à revascularização miocárdica com uso de azul ded metileno: estudo clínico e prospectivo [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.
30. Stawicki SP, Sims C, Sarani B, Grossman MD, Gracias VH. Methylene blue and vasoplegia: who, when, and how? *Mini Rev Med Chem*. 2008 May;8(5):472-90.
31. Salaris SC, Babbs CF, Voorhees WD 3rd. Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xanthine oxidase. A potential new drug for the attenuation of ischemia/reperfusion injury. *Biochem Pharmacol*. 1991 Jul 15;42(3):499-506.
32. Alvarez A, Moreno P, Illana J, Espinosa D, Baamonde C, Arango E, Algar FJ, Salvatierra A. Influence of donor-recipient gender mismatch on graft function and survival following lung transplantation. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013 Apr;16(4):426-35.
33. Cardoso PFG, Pazetti R, Moryia HT, Pêgo-Fernandes PM, Almeida FM, Correia AT, Fechini K, Jatene FB. Modelo experimental de perfusão

- pulmonar ex vivo em ratos: avaliação de desempenho de pulmões submetidos à administração de prostaciclina inalada versus parenteral. *J. bras. pneumol.* 2011;37(5):589-97.
34. Koller ME, Reed RK. Increased negativity of interstitial fluid pressure in rat trachea in dextran anaphylaxis. *J Appl Physiol.* 1992 Jan;72(1):53-7.
35. Reis A, Giaid A, Serrick C, Shennib H. Improved outcome of rat lung transplantation with modification of the nonsuture external cuff technique. *J Heart Lung Transplant.* 1995 Mar-Apr;14(2):274-9.
36. Sánchez PG, Martins LK, Martins FK, Schimer R, Cardoso PFG, Andrade CF. Modificação da técnica de alotransplante unilateral em ratos. *J. bras. pneumol.* 2007;33(4):448-53.
37. Mizuta T, Kawaguchi A, Nakahara K, Kawashima Y. Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989 Apr;97(4):578-81.
38. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Oct;35(4):457-65.
39. Vieira RP. *Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.
40. Kageyama N. A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. *Clin Chim Acta.* 1971 Feb;31(2):421-6.
41. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988 May;96(5):379-94.

-
42. Xie C, Ma L, Liu J, Li X, Pei H, Xiang M, Chen L. SKLB023 blocks joint inflammation and cartilage destruction in arthritis models via suppression of nuclear factor-kappa B activation in macrophage. *PLoS One*. 2013;8(2):e56349.
 43. Morimoto Y, Hirohashi M, Ogami A, Oyabu T, Myojo T, Nishi K, Kadoya C, Todoroki M, Yamamoto M, Murakami M, Shimada M, Wang WN, Yamamoto K, Fujita K, Endoh S, Uchida K, Shinohara N, Nakanishi J, Tanaka I. Inflammogenic effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies. *Part Fibre Toxicol*. 2010 Mar 14;7:4.
 44. Fiscus RR, Yuen JP, Chan SL, Kwong JH, Chew SB. Nitric oxide and cyclic GMP as pro- and anti-apoptotic agents. *J Card Surg*. 2002 Jul-Aug;17(4):336-9.
 45. Shaw CA, Webb DJ, Rossi AG, Megson IL. Cyclic GMP protects human macrophages against peroxynitrite-induced apoptosis. *J Inflamm (Lond)*. 2009 May 7;6:14.
 46. Ischiropoulos H. Living and dying with reactive species. Focus on "peroxynitrite induces apoptosis of HL-60 cells by activation of a caspase-3 family protease". *Am J Physiol*. 1998 Apr;274(4 Pt 1):C853-4.
 47. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999 Feb;6(2):99-104.
 48. Shen X, Zhao G, Wang R, Liu T, Liu L. Protective effect of propofol and resveratrol pretreatment against hepatocyte apoptosis in rats with hepatic ischemia-reperfusion injury. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2013 Jan;33(1):80-5.
 49. Souza PC. *Estudo da participação do colágeno V no câncer de pulmão, especificamente no carcinoma não de pequenas células* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

-
50. Lin X, Li W, Lai J, Okazaki M, Sugimoto S, Yamamoto S, Wang X, Gelman AE, Kreisel D, Krupnick AS. Five-year update on the mouse model of orthotopic lung transplantation: Scientific uses, tricks of the trade, and tips for success. *J Thorac Dis*. 2012 Jun 1;4(3):247-58.
 51. Goto T, Kohno M, Anraku M, Ohtsuka T, Izumi Y, Nomori H. Simplified rat lung transplantation using a new cuff technique. *Ann Thorac Surg*. 2012 Jun;93(6):2078-80.
 52. Pieróg J, Kubisa B, Grodzki T, Wójcik J, Pankowski J, Ostrowska J, Juzyszyn Z, Drożdżik M. Colchicine against ischemia-reperfusion injury in experimental lung transplantation. *Ann Transplant*. 2007;12(4):32-7.
 53. Suárez López VJ, Miñambres E, Robles Arista JC, Ballesteros MA. Primary graft dysfunction after lung transplantation. *Med Intensiva*. 2012 Oct;36(7):506-12.
 54. Shah RJ, Bellamy SL, Localio AR, Wickersham N, Diamond JM, Weinacker A, Lama VN, Bhorade S, Belperio JA, Crespo M, Demissie E, Kawut SM, Wille KM, Lederer DJ, Lee JC, Palmer SM, Orens J, Reynolds J, Shah A, Wilkes DS, Ware LB, Christie JD. A panel of lung injury biomarkers enhances the definition of primary graft dysfunction (PGD) after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Sep;31(9):942-9.
 55. Xu M, Wen XH, Chen SP, An XX, Xu HY. Addition of ulinastatin to preservation solution promotes protection against ischemia-reperfusion injury in rabbit lung. *Chin Med J (Engl)*. 2011 Jul;124(14):2179-83.
 56. Quadri SM, Segall L, de Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, Waddell TK, Liu M, Keshavjee S. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transplant*. 2005 Feb;5(2):292-9.
 57. Chatkin JM, Djupesland P, Qian W, Halght J, Zamel N. Oxido nítrico exalado no diagnóstico e acompanhamento das doenças respiratórias. *J. pneumol* 2000 jan.-fev.;26(1):36-43.

-
58. Heron M, Grutters JC, ten Dam-Molenkamp KM, Hijdra D, van Heugten-Roeling A, Claessen AM, Ruven HJ, van den Bosch JM, van Velzen-Blad H. Bronchoalveolar lavage cell pattern from healthy human lung. *Clin Exp Immunol*. 2012 Mar;167(3):523-31.
 59. Vikis HG, Gelman AE, Franklin A, Stein L, Rymaszewski A, Zhu J, Liu P, Tichelaar JW, Krupnick AS, You M. Neutrophils are required for 3-methylcholanthrene-initiated, butylated hydroxytoluene-promoted lung carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 2012 Dec;51(12):993-1002.
 60. Kreisel D, Lai J, Richardson SB, Ibricevic A, Nava RG, Lin X, Li W, Kornfeld CG, Miller MJ, Brody SL, Gelman AE, Krupnick AS. Polarized alloantigen presentation by airway epithelial cells contributes to direct CD8+ T cell activation in the airway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Jun;44(6):749-54.
 61. Kreisel D, Richardson SB, Li W, Lin X, Kornfeld CG, Sugimoto S, Hsieh CS, Gelman AE, Krupnick AS. Cutting edge: MHC class II expression by pulmonary nonhematopoietic cells plays a critical role in controlling local inflammatory responses. *J Immunol*. 2010 Oct 1;185(7):3809-13.
 62. Marqui CE, Silva HC, Ferez D, Cavassani SS, Moraes JB, Silva DA, Simões RS, Lopes CA, Taha MO, Oliveira-Júnior IS. Pretreatment with pentoxifylline attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2011 Dec;26(6):438-44.
 63. Sotoudeh A, Takhtfooladi MA, Jahanshahi A, Asl AH, Takhtfooladi HA, Khansari M. Effect of N-acetylcysteine on lung injury induced by skeletal muscle ischemia-reperfusion. Histopathological study in rat model. *Acta Cir Bras*. 2012 Feb;27(2):168-71.
 64. Castro AP, Castro Junior MA, Lauz S, Facin E, Simões Mde J, Fagundes DJ. The role of N-acetyl-cysteine in the lung remote injury after hepatic ischemia and reperfusion in rabbits. *Acta Cir Bras*. 2012 Jan;27(1):49-55.
 65. Sugimoto R, Tanaka Y, Noda K, Kawamura T, Toyoda Y, Billiar TR, McCurry KR, Nakao A. Preservation solution supplemented with biliverdin

- prevents lung cold ischaemia/reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012 Dec;42(6):1035-41.
66. Ohsumi A, Chen F, Sakamoto J, Nakajima D, Hijiya K, Motoyama H, Okita K, Horita K, Kikuchi R, Yamada T, Bando T, Date H. Protective effect of pre-recovery surfactant inhalation on lungs donated after cardiac death in a canine lung transplantation model. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Oct;31(10):1136-42.
67. Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol*. 1997 May;150(5):1773-84.
68. Medeiros IL, Pêgo-Fernandes PM, Mariani AW, Fernandes FG, Unterpertinger FV, Canzian M, Jatene FB. Comparison of lung preservation solutions in human lungs using an ex vivo lung perfusion experimental model. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012 Sep;67(9):1101-6.
69. Paulus P, Ockelmann P, Tacke S, Karnowski N, Ellinghaus P, Scheller B, Holfeld J, Urbschat A, Zacharowski K. Deguelin attenuates reperfusion injury and improves outcome after orthotopic lung transplantation in the rat. *PLoS One*. 2012;7(6):e39265.
70. Jungraithmayr W, De Meester I, Matheeussen V, Baerts L, Arni S, Weder W. CD26/DPP-4 inhibition recruits regenerative stem cells via stromal cell-derived factor-1 and beneficially influences ischaemia-reperfusion injury in mouse lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012 May;41(5):1166-73.
71. Knudsen L, Boxler L, Mühlfeld C, Schaefer IM, Becker L, Bussinger C, von Stietencron I, Madershahian N, Richter J, Wahlers T, Wittwer T, Ochs M. Lung preservation in experimental ischemia/reperfusion injury and lung transplantation: a comparison of natural and synthetic surfactants. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Jan;31(1):85-93.

-
72. Emaminia A, Lapar DJ, Zhao Y, Steidle JF, Harris DA, Laubach VE, Linden J, Kron IL, Lau CL. Adenosine A₂A agonist improves lung function during ex vivo lung perfusion. *Ann Thorac Surg*. 2011 Nov;92(5):1840-6.
73. Kelner MJ, Bagnell R, Hale B, Alexander NM. Potential of methylene blue to block oxygen radical generation in reperfusion injury. *Basic Life Sci*. 1988;49:895-8.
74. Santos CX, Anjos EI, Augusto O. Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. *Arch Biochem Biophys*. 1999 Dec 15;372(2):285-94.
75. Becker BF, Reinholz N, Ozçelik T, Leipert B, Gerlach E. Uric acid as radical scavenger and antioxidant in the heart. *Pflugers Arch*. 1989 Nov;415(2):127-35.
76. Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med*. 1993 Jun;14(6):615-31.
77. Andranovich T, Kelner MJ. In vitro oxidation of uric acid in serum by methylene blue. *Clin Chem*. 1986 Jan;32(1 Pt 1):177-9.
78. Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, Moreira JF, Keshavjee S. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Nov;162(5):1932-9.
79. Weinbroum AA. Methylene blue attenuates pancreas ischemia-reperfusion (IR)-induced lung injury: a dose response study in a rat model. *J Gastrointest Surg*. 2009 Sep;13(9):1683-91.
80. Meirelles RF Jr, Ceneviva R, Viaro F, Baldo CF, Evora PR. Methylene blue improves hemodynamic shock but increases lipoperoxidation in severe acute pancreatitis pig model. *Acta Cir Bras*. 2008;23 Suppl 1:8-16; discussion 16.

81. Samano MN, Fernandes LM, Baranauskas JC, Correia AT, Afonso JE Jr, Teixeira RH, Caramori ML, Pêgo-Fernandes PM, Jatene FB. Risk factors and survival impact of primary graft dysfunction after lung transplantation in a single institution. *Transplant Proc.* 2012 Oct;44(8):2462-8.