

PAOLO OLIVEIRA MELO

Ativação da ECA2 na prevenção da lesão pulmonar aguda em modelo
experimental de transplante pulmonar

São Paulo

2024

PAOLO OLIVEIRA MELO

**Ativação da ECA2 na prevenção da lesão pulmonar aguda em modelo
experimental de transplante pulmonar**

Versão Original

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo
Fernandes

São Paulo
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira Melo, Paolo

Ativação da ECA2 na prevenção da lesão pulmonar aguda em modelo experimental de transplante pulmonar / Paolo Oliveira Melo; Paulo Manuel Pêgo Fernandes, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1. Transplante de pulmão 2. Morte encefálica 3. Pneumonia aspirativa 4. Enzima de conversão de angiotensina 2 5. Sistema renina-angiotensina 6. Tratamentos com preservação do órgão 7. Lesão pulmonar aguda I. Fernandes, Paulo Manuel Pêgo, orient. II. Título.

USP/FM/DBD-189/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Nome: Paolo Oliveira Melo

Título: Ativação da ECA2 na prevenção da lesão pulmonar aguda em modelo experimental de transplante pulmonar

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Conceito Obtido:

Banca Examinadora

Prof. Dra. Carla Maximo Prado

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Julgamento:

Prof. Dr. Fernando Luiz Zanoni

Instituição: Instituto do Coração do HCFMUSP

Julgamento:

Prof. Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP

Julgamento:

Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes (Orientador)

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP

Julgamento:

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese é resultado não só de um empenho individual, mas de esforços geracionais e da contribuição quase incondicional de amigos. Portanto, preciso agradecer as pessoas que me ajudaram a sedimentar esse caminho.

Aos meus avós, por todo empenho realizado para educar seus filhos, permitindo com que hoje eu avance mais um passo nesse “empreendimento” familiar.

A minha Mãe (Maria das Graças Oliveira Melo), que apesar de ter deixado este plano ainda no final de minha graduação, chegou a sonhar e idealizar todas as etapas de minha formação acadêmica. Amo você muito e para sempre.

A meu Pai (Antônio Cláudio Holanda Melo), por sempre tentar me blindar de preocupações alheias ao doutorado e por seu amor incondicional. “De mais longe viemos”, ainda mais longe iremos. Te amo.

A minha irmã (Marisa Oliveira Melo), por toda a paciência e companheirismo ao longo desse trajeto, se fazendo presente onde quer que eu esteja. Te amo.

Ao meu amigo/irmão (Renato Elias Biral), por todo seu companheirismo ao longo dos primeiros anos dessa jornada, sempre paciente para escutar meus desabafos por longas horas ao telefone, e pelos momentos de alegria que compartilhamos juntos. Espero que onde você estiver, esteja bem. Te amo.

A minha família, em especial Tia Auxiliadora e Marcinha, por serem alicerce para meu desenvolvimento, e por entender minhas ausências durante este percurso.

A meu orientador Prof. Paulo Manuel Pêgo Fernandes, por ter me acolhido no seu grupo, por todas as oportunidades a mim concedidas e pelas conversas que muito contribuíram para minha formação profissional e realização deste trabalho.

Ao meu orientador no exterior, Prof. Marcelo Cypel, por ter me recebido de maneira calorosa em seu laboratório e me integrado ao seu grupo, pelas discussões científicas e oportunidades.

Ao Prof. Paulo Cardoso, por acreditar no meu potencial desde o começo desse projeto, sempre com sugestões de livros, conselhos e palavras de motivação.

Aos professores membros da banca, pela disponibilidade e contribuição para as avaliações do trabalho.

A amiga Natalia Nepomuceno e Liliane Ruiz, por todas as vezes que suportaram meu estresse durante essa jornada, por ouvir meus desabafos, e claro, por me ensinarem como estabelecer os modelos animais de morte encefálica e transplante pulmonar.

A amiga Karina Andrighetti (e família), que por meio de sua clareza e discernimento, me ajudou a enfrentar as situações que pareciam incontornáveis. Agradeço também por todos os papos filosóficos e cotidianos (regados a um bom vinho) que tivemos ao longo desse período.

Ao amigo Aristides Correia por todas as discussões científicas (que por vezes entrava a noite) e por ser exemplo de determinação e ética, pontos fundamentais para um cientista.

Aos amigos do LIM-61, em especial Vanessa Sana, Tatiana Machado, Giovana Manzutti, Priscila Berenice e Gabriela Faria pelas discussões científicas, ajuda nos experimentos, momentos de descontração e palavras de incentivo que foram fundamentais ao longo dessa jornada.

Ao amigo Fernando Pedro por todos os conselhos científicos (que inclusive resultaram na escolha do uso de ativadores da ECA2) e por compartilhar tantos momentos marcantes ao longo desta etapa, sempre com muito otimismo e serenidade, pois “uma vida, uma chance”.

Ao amigo Prof. Emanuel Kennedy Feitosa Lima, o qual serei orgulhosamente sempre “IC”, por acreditar no meu potencial desde o começo de minha jornada científica, por todos os momentos de aconselhamento profissional e pessoal.

Aos amigos Anderson Cruz, Gabriela Carneiro, Rodrigo Almeida, Larissa Lira e Yara Albuquerque pelo companheirismo e amizade, que provam que mesmo de longe sempre torcem por mim.

Aos colegas da University Health Network, Aizhou Wang, Guillermo Garza, Jenny Yune, Keiji Yamanashi, Gabriel Sibieger, Juan Montagne, Nadav Furie, Yu Zhang e Nicholas Bernards, pelos ensinamentos, paciência e companheirismo durante meu período em Toronto.

A minha terapeuta Emanuely Pereira, pelo seu profissionalismo e suporte ao longo dos últimos anos.

Ao Prof. Gilvan Silva, por sempre acreditar que meu sonho do estágio no exterior seria possível e por toda a ajuda com o inglês, não importando a situação ou hora.

Ao Prof. Bruno Andrade Cardi, responsável por me apresentar os caminhos da pesquisa científica, sendo, ainda hoje, fonte de inspiração pelo seu conhecimento e humildade.

A Profa. Crystianne Calado Lima, por acreditar e incentivar meus sonhos desde os tempos de iniciação científica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste.

*“Quando eu vim do sertão, seu môço,
do meu Bodocó, a malota era um
saco e o cadeado era um nó. Só
trazia a coragem e a cara, viajando
num pau-de-arara. Eu penei, mas
aqui cheguei. Eu penei, mas aqui
cheguei”.*

(Luiz Gonzaga / Guio De Moraes)

RESUMO

Oliveira Melo P. Ativação da ECA2 na prevenção da lesão pulmonar aguda em modelo experimental de transplante pulmonar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

A morte encefálica (ME) provê a maioria dos órgãos destinados ao transplante pulmonar (LTx). No entanto, estes órgãos podem ter sido afetados por processos de contusão, lesão induzida por ventilação ou aspiração de conteúdo gástrico. Visto que a ativação do eixo protetor do sistema renina-angiotensina (SRA) já apresentou efeitos protetores em diferentes doenças respiratórias, foi gerada a hipótese que a ativação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) pode reduzir as alterações deletérias associadas ao LTx. *Estudo I*: 3 horas após o estabelecimento da ME, ratos foram tratados com solução salina (ME) ou ativador da ECA2 (DIZE; 15 mg/kg) e mantidos em ventilação por mais 3 horas. Um terceiro grupo incluiu ventilação controle previamente ao LTx (CTR). *Estudo II*: A lesão por aspiração foi estabelecida a partir da instilação intratraqueal de ácido clorídrico (HCl; 0.1N). Após o estabelecimento da lesão do doador, os pulmões foram randomizados para pré-condicionamento com ativador da ECA2 (DIZE; 0.1 mM) ou angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7); 0.22 nM] e mantidos à 10°C por 12 horas. Um grupo adicional foi incluído para avaliação de condições de mínimo tempo de preservação (MinCIT). O pulmão esquerdo foi imediatamente transplantado após a o período de ME (*Estudo I*) e preservação (*Estudo II*). Os resultados dos estudos sugerem que a modulação do eixo protetor do SRA melhora o comprometimento associado ao LTx, como demonstrado pela melhora da função, da atividade anti-inflamatória e antioxidante, bem como pela manutenção da dinâmica mitocondrial e celular do enxerto. Portanto, a ativação da ECA2, bem como a administração direta de Ang-(1-7), constitui-se como abordagem farmacológica promissora no manejo do doador ou durante a preservação hipotérmica estática do enxerto pulmonar.

Palavras-chave: 1. Transplante de pulmão, 2. Morte encefálica, 3. Pneumonia aspirativa, 4. Enzima de conversão de angiotensina 2, 5. Sistema renina-angiotensina, 6. Tratamentos com preservação do órgão, 7. Lesão pulmonar aguda.

ABSTRACT

Oliveira Melo P. Activation of ACE2 in the prevention of acute lung injury in an experimental model of lung transplantation [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

Brain death (BD) provides most of the donor organs for lung transplantation (LTx). However, the organs may be affected by contusion, ventilator-induced lung injury or aspiration of gastric contents. Based on this, we hypothesize that the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) activation can reduce the lung injury associated with LTx. *Study I*: 3 hours after BD induction, rats were injected with saline (BD) or an ACE2 activator (DIZE; 15 mg/kg) and kept on mechanical ventilation for additional 3 hours. A third group included a control ventilation prior to LTx (CTR). *Study II*: Aspiration injury was created through intratracheal instillation (HCl; 0.1N). Acid injured donor lungs were randomized to lungs flushed with ACE2 activator (DIZE; 0.1 mM) or angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7); 0.22 nM] and stored for 12 hours at 10°C. A third group included immediate transplantation (MinCIT). The left lungs were immediately transplanted after BD (*Study I*) and preservation (*Study II*). The results suggest that modulation of the renin-angiotensin system (RAS) protective axis improves the ischemia-reperfusion injury associated with LTx, as demonstrated by the improvement in function, anti-inflammatory and antioxidant activity, in addition to the maintenance of mitochondrial and cellular dynamics of the graft. Therefore, the ACE2 activation, as well as the direct administration of Ang-(1-7), constitutes a promising pharmacological approach in donor management or during static graft hypothermic preservation.

Keywords: 1. Lung transplantation, 2. Brain death, 3. Aspiration injury, 4. Angiotensin-converting enzyme 2, 5. Angiotensin-(1-7), 6. Organ preservation, 7. Acute lung injury.

LISTA DE PUBLICAÇÕES E APRESENTAÇÕES

RESUMOS PUBLICADOS

1. **Paolo Oliveira**, Aizhou Wang, Keiji Yamanashi, Gabriel Siebiger, Yu Zhang, Guillermo Garza, Juan Montagne, Nadav Furie, Jenny Yune, Paulo Pêgo-Fernandes, Marcelo Cypel. Repairing Aspiration Injured Donor Lungs Through Angiotensin-(1-7) Preconditioning During Static 10°C Preservation. In: The Ajmera Transplant Centre 3rd Annual Education and Research Conference, Toronto, Canada, Jun 14, 2024.
2. **Oliveira-Melo, P.**; Nepomuceno, N. A.; Ruiz, L. M.; Correia, A.; Vilela, S. V.; Manzuti, G.; Braga, K. A. O.; Pola, F.; Kennedy-Feitosa, E.; Wang, A.; Cypel, M.; Pêgo-Fernandes, P. M. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activation Attenuates Inflammation After Rat Lung Transplantation. In: The 44th Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation, Prague, Czech Republic, Apr 10-13, 2024.
3. **Oliveira-Melo, P.**; Nepomuceno, N. A.; Ruiz, L. M.; Vilela, S. V.; Manzuti, G.; Braga, K. A. O.; Kennedy-Feitosa, E.; Cypel, M.; Pêgo-Fernandes, P. M. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) modulates lung mechanics in a brain death model and attenuates pulmonary edema after rat lung transplantation. In: *29th International Congress of The Transplantation Society*, 2022, Buenos Aires, Argentina.
4. **Oliveira-Melo, P.**; Nepomuceno, N. A.; Ruiz, L. M.; Braga, K. A. O.; Kennedy-Feitosa, E.; Pêgo-Fernandes, P. M. Ativação da ECA2 modula função hemodinâmica e reduz as alterações do parênquima pulmonar associadas a modelo animal de doador de pulmão. In: *XVII Congresso Brasileiro de Transplantes*, 2021, São Paulo, Brasil.

APRESENTAÇÃO ORAL

1. *29th International Congress of The Transplantation Society*, Buenos Aires, Argentina (2022).
2. *XVII Congresso Brasileiro de Transplantes*, São Paulo, Brasil (2021).

APRESENTAÇÃO PÔSTER

1. The Ajmera Transplant Centre 3rd Annual Education and Research Conference, Toronto, Canada (2024).
2. The 44th Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation, Prague, Czech Republic (2024).

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

1. The 44th Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation, Prague, Czech Republic (2024).
2. *AATS – Mechanical Support and Thoracic Summit*, Toronto, Canadá (2023).
3. *29th International Congress of The Transplantation Society*, Buenos Aires, Argentina (2022).
4. *XVII Congresso Brasileiro de Transplantes*, São Paulo, Brasil (2021).

PREMIAÇÕES E TÍTULOS

1. Revisor de Periódico – *Journal of Ethnopharmacology* (2023-Presente).
2. Scholarship granted – Split Fellowship Program, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (2023).
3. Scholarship granted – Research Trainee, Latner Thoracic Surgery Research Laboratories, Toronto General Hospital, University Health Network (2022).
4. Scholarship granted – *Transplantation Medicine Summer School*, University of Groningen (2021).

SUPORTE FINANCEIRO

Esta tese foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Processo: 88887.524323/2020-00), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Processo: 200171/2022-4) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Processo: 2022/07610-8).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO DE DIAGNÓSTICO DE RECEPTORES ADULTOS POR LOCAL E ANO.	31
FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO ANUAL DO NÚMERO DE TRANSPLANTES PULMONARES NO BRASIL.	32
FIGURA 3. NÚMERO DE DOADORES DE PULMÃO POR ANO.	34
FIGURA 4. REFLEXO DE CUSHING.	35
FIGURA 5. ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DURANTE A LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO PULMONAR.	47
FIGURA 6. MODELO ORTOTÓPICO DE TRANSPLANTE PULMONAR EM RATOS.	49
FIGURA 7. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS EIXOS CLÁSSICO (VERMELHO) E PROTETOR (VERDE) DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA) NO PULMÃO.	51
FIGURA 8. ESTRUTURA QUÍMICA DO ACETURATO DE DIMINAZENO (DIZE).	53
FIGURA 9. DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO I.	62
FIGURA 10. DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO II.	63
FIGURA 11. TÉCNICA DOS CUFFS UTILIZADA PARA IMPLANTE DO ENXERTO.	66
FIGURA 12. TÉCNICAS PARA O IMPLANTE DOS ENXERTOS.	67
FIGURA 13. ESQUEMA MOSTRANDO ANIMAL VS. VENTILADOR VS. SOFTWARE.	69
FIGURA 14. TRAÇADOS ILUSTRATIVOS DAS PERTURBAÇÕES “QUICK-PRIME”.	69
FIGURA 15. TRAÇADOS ILUSTRATIVOS DAS CURVAS PRESSÃO-VOLUME.	70
FIGURA 16. QUANTIFICAÇÃO DO PROCESSO DE APOPTOSE CELULAR NO PARÊNQUIMA PULMONAR APÓS TRANSPLANTE.	74
FIGURA 17. O ESTABELECIMENTO DO MODELO ANIMAL DE MORTE ENCEFÁLICA RESULTA NO COMPROMETIMENTO DA FUNÇÃO PULMONAR DO DOADOR.	79
FIGURA 18. A ATIVAÇÃO DA ECA2 DURANTE O MANEJO DOS DOADORES DE MORTE ENCEFÁLICA MELHORA A QUALIDADE DO ENXERTO.	82
FIGURA 19. A ATIVAÇÃO PRÉVIA DA ECA2 DURANTE O MANEJO DA MORTE ENCEFÁLICA NÃO SE TRADUZ EM MELHORA DA FUNÇÃO PRECOCE DO ENXERTO PÓS-TRANSPLANTE.	84
FIGURA 20. A ATIVAÇÃO DA ECA2 REDUZ A RESPOSTA INFLAMATÓRIA ASSOCIADA À LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO.	86
FIGURA 21. A ATIVAÇÃO DA ECA2 DURANTE O MANEJO DA MORTE ENCEFÁLICA MODULA O DESEQUILÍBRIO REDOX APÓS A REPERFUSÃO.	87
FIGURA 22. SÍTIOS DE ATIVIDADE DO DIZE NA LESÃO PULMONAR AGUDA ASSOCIADA AO TRANSPLANTE PULMONAR.	90
FIGURA 23. LESÃO PULMONAR INDUZIDA POR ASPIRAÇÃO DE ÁCIDO RESULTA NA DETERIORAÇÃO DA FUNÇÃO PULMONAR DO DOADOR.	91

FIGURA 24. O ENRIQUECIMENTO DA SOLUÇÃO DE PRESERVAÇÃO COM DIZE OU ANGIOTENSINA-(1-7) DURANTE A PRESERVAÇÃO HIPOTÉRMICA RESULTA NA MELHORA DA FUNÇÃO DO ENXERTO APÓS O TRANSPLANTE PULMONAR.	93
FIGURA 25. O PRÉ-CONDICIONAMENTO COM ANGIOTENSINA-(1-7) DURANTE A PRESERVAÇÃO HIPOTÉRMICA ATENUA AS RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS ASSOCIADAS A REPERFUSÃO DO ENXERTO.	94
FIGURA 26. O ENRIQUECIMENTO DA SOLUÇÃO DE PRESERVAÇÃO COM ANGIOTENSINA-(1-7) DURANTE A PRESERVAÇÃO HIPOTÉRMICA PROMOVE CITOPROTEÇÃO.	96
FIGURA 27. A MELHORA DA FUNÇÃO DO ENXERTO PULMONAR APÓS O CONDICIONAMENTO COM ANGIOTENSINA-(1-7) É DEPENDENTE DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR MAS.	98
FIGURA 28. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO MOSTRANDO O EFEITO PROTETOR DA ANGIOTENSINA-(1-7) DURANTE A PRESERVAÇÃO HIPOTÉRMICA ESTÁTICA E SEUS MECANISMOS SUBJACENTES.	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS DO PARÊNQUIMA PULMONAR EM MODELOS DE LESÃO CEREBRAL E MORTE ENCEFÁLICA.	37
TABELA 2. REPERCUSSÕES PULMONARES ASSOCIADAS AOS MODELOS DE ASPIRAÇÃO DE CONTEÚDO GÁSTRICO.	42
TABELA 3. DEFINIÇÃO E GRAUS DE SEVERIDADE DA DPE SEGUNDO A SOCIEDADE INTERNACIONAL PARA O TRANSPLANTE DE CORAÇÃO E PULMÃO (2016).....	45
TABELA 4. CARACTERÍSTICAS GASOMÉTRICAS E METABÓLICAS DE RATOS CONTROLE E SUBMETIDOS À MORTE ENCEFÁLICA.	79
TABELA 5. VALORES DE MECÂNICA PULMONAR EM RATOS CONTROLE E SUBMETIDOS À MORTE ENCEFÁLICA.	81
TABELA 6. FATORES OPERATÓRIOS NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE ENTRE OS GRUPOS.....	83
TABELA 7. CARACTERÍSTICAS GASOMÉTRICAS E METABÓLICAS DE RATOS SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE PULMONAR.	85
TABELA 8. CARACTERÍSTICAS BASAIS DOS ANIMAIS RECEPTORES E FATORES OPERATÓRIOS.....	92
TABELA 9. NÚMERO DE AUMENTO DE VEZES DOS MARCADORES DE EXPRESSÃO GÊNICA MITOCONDRIAL TECIDUAL APÓS PRÉ-CONDICIONAMENTO COM ANG-(1-7) E REPERFUSÃO PULMONAR.	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
η	Histeresividade
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
AT1R	Receptor para angiotensina do tipo I
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
CAT	Catalase
CI	Capacidade inspiratória
C_{st}	Complacência estática
DIZE	Aceturato de diminazeno
DPE	Disfunção primária do enxerto
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FiO₂	Fração inspirada de oxigênio
FIS1	Fissão 1 (membrana externa mitocondrial)
G	Resistência tecidual
H	Elastância tecidual
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
ISHLT	Sociedade Internacional para o Transplante de Coração e Pulmão
LAS	Escore de alocação de pulmão
LBA	Lavado broncoalveolar
LIR	Lesão por isquemia-reperfusão

LPA	Lesão pulmonar aguda
MasR	Receptor para angiotensina-(1-7)
MDA	Malondialdeído
MFF	Fator de fissão mitocondrial
MFN1	Mitofusina 1
MFN2	Mitofusina 2
MinCIT	Mínimo tempo de isquemia fria (transplante imediato)
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
OPA1	Homólogo de atrofia óptica 1 (humano)
PAM	Pressão arterial média
PaO₂	Pressão arterial de oxigênio
PARK2	Doença de Parkinson 2, parkin
PEEP	Pressão positiva ao final da expiração
PIC	Pressão intracraniana
PINK1	PTEN quinase induzida 1
PPARG	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama
PPARGc1A	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama, coativador 1 alfa
PPARGc1B	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama, coativador 1 beta
R_N	Resistência newtoniana
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Sistema renina-angiotensina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCE	Traumatismo cranioencefálico
TFAM	Fator de transcrição mitocondrial A
TUNEL	Deoxinucleotidil terminal transferase
XT	Xantenona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1 TRANSPLANTE PULMONAR	27
2.1.1 <i>Definição e histórico</i>	27
2.1.2 <i>Princípios para a indicação ao transplante de pulmão</i>	29
2.1.3 <i>Dimensionamento dos transplantes de pulmão</i>	31
2.1.4 <i>Critérios para doação de pulmão</i>	32
2.2 MORTE ENCEFÁLICA.....	33
2.2.1 <i>Definição e epidemiologia</i>	33
2.2.2 <i>Complicações decorrentes do evento de morte encefálica</i>	34
2.2.3 <i>Alterações pulmonares decorrentes da morte encefálica</i>	36
2.2.4 <i>Modelos animais de morte encefálica</i>	39
2.3 PNEUMONITE ASPIRATIVA	40
2.3.1 <i>Definição e epidemiologia</i>	40
2.3.2 <i>Alterações pulmonares decorrentes do evento de aspiração de conteúdo gástrico</i>	41
2.3.3 <i>Modelos animais de pneumonite aspirativa</i>	43
2.4 DISFUNÇÃO PRIMÁRIA DO ENXERTO (DPE)	44
2.4.1 <i>Fisiopatologia da DPE</i>	44
2.4.2 <i>Modelos animais de isquemia-reperfusão</i>	48
2.5 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)	49
2.5.1 <i>Ativadores do eixo protetor do SRA</i>	52
3 JUSTIFICATIVA	55
4 OBJETIVO.....	58
4.1 OBJETIVO GERAL	58
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
5 MATERIAL E MÉTODOS	60
5.1 ANIMAIS	61
5.2 DESENHO EXPERIMENTAL	61
5.2.1 <i>Estudo I – Modelo de morte encefálica + transplante pulmonar</i>	61
5.2.1 <i>Estudo II – Modelo de pneumonite aspirativa + transplante pulmonar</i>	62
5.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	64
5.3.1 <i>Modelo experimental de morte encefálica</i>	64

5.3.2 Modelo experimental de pneumonite aspirativa	65
5.3.3 Extração do bloco cardiopulmonar	65
5.3.4 Modelo experimental de transplante pulmonar	66
5.4 ANÁLISES DE FUNÇÃO PULMONAR	68
5.4.1 Efetividade da troca gasosa	68
5.4.2 Análise da mecânica pulmonar	68
5.5 ANÁLISE DA RAZÃO PESO ÚMIDO/SECO.....	71
5.6 DOSAGEM DE CITOCINAS NO TECIDO PULMONAR	71
5.7 MARCADORES REDOX NO TECIDO PULMONAR.....	72
5.8 COMPONENTES DO SRA E ATIVIDADE DA ECA2 NO TECIDO PULMONAR	72
5.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PULMONAR.....	73
5.10 AVALIAÇÃO DE MARCADOR PARA MORTE CELULAR	74
5.11 IMUNOHISTOQUÍMICA	75
5.12 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	75
5.13 ANÁLISE DOS DADOS E ESTATÍSTICA	75
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
6.1 ESTUDO I – A ATIVAÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA 2 (ECA2) REDUZ O PROCESSO INFLAMATÓRIO E O ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE MORTE ENCEFÁLICA SEGUIDO POR TRANSPLANTE PULMONAR EM RATOS.	78
6.1.1 O estabelecimento do modelo animal de morte encefálica resulta no comprometimento da função pulmonar do doador.	78
6.1.2 A ativação da ECA2 durante o manejo dos doadores de morte encefálica melhora a qualidade do enxerto.	80
6.1.3 A ativação prévia da ECA2 durante o manejo da morte encefálica não se traduz em melhora da função precoce do enxerto pós-transplante.....	83
6.1.4 A ativação da ECA2 reduz a resposta inflamatória associada à lesão por isquemia-reperfusão.	85
6.1.5 A ativação da ECA2 durante o manejo da morte encefálica modula o desequilíbrio redox após a reperfusão.	86
6.2 ESTUDO I – DISCUSSÃO	87
6.3 ESTUDO II – O PRECONDICIONAMENTO COM ATIVADOR DE ECA2 OU ANGIOTENSINA-(1-7) DURANTE A PRESERVAÇÃO HIPOTÉRMICA ESTÁTICA MELHORA A FUNÇÃO DO ENXERTO APÓS A REPERFUSÃO EM MODELO DE TRANSPLANTE PULMONAR.	90
6.3.1 Lesão pulmonar induzida por aspiração de ácido resulta na deterioração da função pulmonar do doador.	90
6.3.2 O enriquecimento da solução de preservação com DIZE ou angiotensina-(1-7) durante a preservação hipotérmica resulta na melhora da função do enxerto após o transplante pulmonar.	92

6.3.3 O pré-condicionamento com angiotensina-(1-7) durante a preservação hipotérmica atenua as respostas inflamatórias associadas a reperfusão do enxerto.	93
6.3.4 O enriquecimento da solução de preservação com angiotensina-(1-7) durante a preservação hipotérmica promove citoproteção.	95
6.3.5 A melhora da função do enxerto pulmonar após o condicionamento com angiotensina-(1-7) é dependente da ativação do receptor Mas.	97
6.4 ESTUDO II – DISCUSSÃO	98
7 CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS.....	105
APÊNDICE 1	123
APÊNDICE 2	124

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço das técnicas cirúrgicas e de imunossupressão ao longo das últimas décadas, o transplante pulmonar passou a ser considerado como estratégia terapêutica viável para diferentes tipos de doenças pulmonares progressivas (AFONSO JÚNIOR et al., 2015; HARTERT et al., 2014; MARTIN et al., 2019; MEYER, 2018).

Este reconhecimento, levou a ampliação dos critérios para indicação ao transplante de pulmão, favorecendo um aumento exponencial no número de pacientes em listas de espera. Até março de 2024, por exemplo, a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) registrou a marca de 164 brasileiros com necessidade estimada de transplante pulmonar. Apesar da alta demanda, e na contramão dos outros transplantes de órgãos sólidos, os transplantes de pulmão no Brasil foram 37,5% inferior à meta para 2024 (CHAMBERS et al., 2017; REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES, 2024).

Entre as possíveis causas que contribuem para o baixo número de transplantes de pulmão realizados, quando comparado a outros órgãos, destaca-se a pequena quantidade de pulmões considerados viáveis para o processo de doação e o curto tempo de isquemia fria (< 6h). Nesse sentido, tem sido cada vez mais estudada a influência da morte encefálica, e de outros eventos deletérios, tais como episódios de aspiração de conteúdo gástrico, no estabelecimento de lesão no pulmão destinado à doação (CEULEMANS; INCI; VAN RAEMDONCK, 2019; CHANEY et al., 2014; D'IMPÉRIO, 2007; INCI, 2017; JIMÉNEZ-CASTRO; GRACIA-SANCHO; PERALTA, 2015; MARSHALL, 2001; MORRISSEY; MONACO, 2014; PÊGO-FERNANDES et al., 2011; PUNCH et al., 2007; SANA VILELA et al., 2024; WIJDICKS et al., 2010).

Vários relatos evidenciam que a tempestade de catecolaminas causada pelo processo de morte encefálica e a pneumonite química originada a partir da aspiração de conteúdo gástrico pode favorecer o aumento na produção de fatores pró-inflamatórios, contribuindo para a indução de lesão pulmonar aguda (LPA), e aumento da incidência de disfunção primária do enxerto (DPE) após o transplante pulmonar (MARIK, 2001; MARSHALL, 2001; MORRISON; PITHER;

FISHER, 2017; NAKAGAWA; TANG, 2011; PORTEOUS; LEE, 2017; RAGHAVENDRAN et al., 2011; SMITH, 2004).

Ao longo dos últimos anos, diversas estratégias preventivas têm sido avaliadas, objetivando a redução do dano oxidativo, inflamatório e vascular causados pelos eventos supracitados. Nesse sentido, tendo em vista o papel do eixo protetor do sistema renina-angiotensina (SRA) na regulação de diversos processos fisiológicos, os ativadores e os produtos finais desse eixo, apresentam-se como potenciais agentes preventivos da LPA associada ao transplante pulmonar, como veremos a seguir (FANG; GAO; LIU, 2019; SANTOS et al., 2018; VELKOSKA; PATEL; BURRELL, 2016; ZAMBELLI et al., 2015).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRANSPLANTE PULMONAR

2.1.1 Definição e histórico

Ao longo das últimas décadas o transplante pulmonar tem sido mundialmente reconhecido como estratégia terapêutica para pneumopatias avançadas. Admitido quando outras intervenções menos invasivas não respondem de forma eficaz, o transplante objetiva melhorar a qualidade e a expectativa de vida de pessoas acometidas por diferentes tipos de doenças pulmonares progressivas (BOS et al., 2020; MARTIN et al., 2019; MEYER, 2018).

Apesar dos recentes avanços nesta área de conhecimento, os primeiros relatos técnicos que serviriam de alicerce para a realização dos transplantes pulmonares datam de 1907, quando o francês Alexis Carrel fundou as bases metodológicas para o transplante de órgãos sólidos, ao descrever diferentes técnicas de anastomoses para vasos sanguíneos. A ampliação de possibilidades, geradas a partir de seus achados, permitiu o início de um século de descobertas e avanços para a implantação de enxertos pulmonares, como demonstrado a princípio pelo próprio ganhador do prêmio Nobel (1912), ao realizar um transplante cardiopulmonar heterotópico (enxerto implantado no pescoço de um felino adulto) (ALEXIS CARREL, 1907; VENUTA; VAN RAEMDONCK, 2017).

As quatro décadas que sucedem são marcadas não só por diversas tentativas pouco exitosas de transplante pulmonar, mas também por avanços das metodologias cirúrgicas. É nesse contexto que, em 1947, após o refinamento das técnicas pré-existentes, o fisiologista e cirurgião soviético Vladimir Demikhov reporta o primeiro transplante de coração e pulmão realizado com sucesso em cães. Em contrapartida ao êxito obtido, o primeiro animal receptor sobreviveu apenas por 2 horas (DEMIKHOV, 1962; SHOJA et al., 2010).

As descobertas de Demikhov abriram fronteiras, que permitiriam que, em 1963, após realizar centenas de transplantações experimentais bem sucedidas, a equipe do Dr. James Hardy realiza-se a primeira tentativa de transplante pulmonar em humanos. Embora diferentes progressos tenham sido realizados, o paciente destinatário não se apresentava como um bom candidato ao transplante, este fato, somado ao regime imunossupressor da época, favoreceu o estabelecimento de um desfecho clínico negativo, com o paciente indo à óbito por falência renal no décimo primeiro dia do pós-operatório (HARDY et al., 1963a, 1963b; VENUTA; VAN RAEMDONCK, 2017).

Após 23 tentativas em um intervalo de oito anos, o mundo conheceu o primeiro transplantado de pulmão a sobreviver por mais de 10 meses (DEROM, 1971). O redirecionamento das técnicas cirúrgicas e de imunossupressão, posterior as primeiras tentativas de transplante em humanos, favoreceram o aumento da expectativa de vida após o transplante pulmonar, sendo registrado em 1983, o primeiro paciente a sobreviver por mais de um ano. Ainda neste período, o cirurgião Joel Cooper, realizou com sucesso o primeiro transplante de pulmão isolado (transplante unilateral) da “era pós-ciclosporina”, garantindo ao paciente uma sobrevida de 6,5 anos (Este mesmo grupo, 40 anos depois, atingiria a impressionante marca de 3000 transplantes pulmonares) (BRACKEN; GURKOWSKI; NAPLES, 1997; GROVER et al., [s.d.]; TORONTO LUNG TRANSPLANT GROUP, 1986; UNIVERSITY HEALTH NETWORK, 2023).

Em 1987, a Escola Paulista de Medicina inicia os estudos para a formação de seu núcleo de transplante pulmonar. Dois anos mais tarde, a equipe do cirurgião José Camargo realizaria o primeiro transplante pulmonar da América Latina, e conseqüentemente, do Brasil. Realizado em 1989, na Santa Casa de Misericórdia em Porto Alegre, o procedimento cirúrgico garantiu ao paciente uma sobrevida de 10 anos (BISCEGLI JATENE et al., 2009; CAMILA KOSACHENCO, 2019; SUCCI et al., 1991).

A partir da década 90, com o crescimento no número de grupos especializados na realização do transplante pulmonar, o advento de novas modalidades cirúrgicas (unilateral, bilateral em bloco, bilateral sequencial, cardiopulmonar e lobar), tecnológicas e terapêuticas para preservação do órgão, a seleção de candidatos passou a evoluir, assim como a sobrevida ao

transplante (BISCEGLI JATENE et al., 2009; MARTIN et al., 2019; NATHAN, 2015).

2.1.2 Princípios para a indicação ao transplante de pulmão

Inicialmente destinadas a doadores de coração e coração-pulmão, as políticas de alocação de órgãos para pulmões isolados permitiram o aprimoramento na indicação ao transplante pulmonar. Apesar do avanço para a época, as primeiras políticas de alocação de órgãos torácicos tinham caráter simplório, elencando apenas fatores como tempo em lista de espera e compatibilidade sanguínea (ASTP, 1998; EGAN et al., 2006; PANCHABHAI et al., 2018).

A baixa especificidade dos critérios para indicação ao transplante de pulmão, o aumento de pacientes e número de óbitos em lista de espera, e a crescente pressão da comunidade científica para o estabelecimento de metodologias mais sensíveis e assertivas na alocação dos pacientes, contribuiu para o estabelecimento do Escore de Alocação de Pulmão (LAS, do inglês, *Lung Allocation Score*) a partir do ano de 2005 (EGAN et al., 2006).

O LAS objetiva a redução do número de óbitos em lista para transplante pulmonar, o aumento dos benefícios para os pacientes transplantados e a alocação eficiente e equitativa para os potenciais receptores em lista de espera. Acessado por meio de um algoritmo específico, esse escore estima a urgência em lista de espera, a sobrevida pós-transplante e os benefícios advindos do procedimento, gerando, por fim, uma pontuação de alocação que varia de 0 a 100, e uma seleção mais apropriada dos candidatos indicados ao transplante (EGAN et al., 2006).

A comprovação da eficácia e o refinamento na escolha dos potenciais candidatos ao transplante pulmonar tem rompido com antigos paradigmas e estabelecido consensos científicos a cerca da elegibilidade dos potenciais receptores, como pontuado no Consenso de 2014 da Sociedade Internacional para o Transplante de Coração e Pulmão (ISHLT, do inglês, *International Society for Heart and Lung Transplantation*) (WEILL et al., 2015).

De maneira geral, o transplante pulmonar deve ser considerado para adultos com doenças crônicas e/ou pneumopatas em estágio terminal, que se

enquadre nos seguintes critérios: 1) alto (>50%) risco de morte por doença pulmonar dentro de 2 anos caso o transplante não seja realizado; 2) alta (>80%) probabilidade de sobrevivência de pelo menos 90 dias após o transplante pulmonar; e 3) alta (>80%) probabilidade de sobrevida pós-transplante em 5 anos de uma perspectiva clínica geral, com função adequada do enxerto (WEILL et al., 2015).

Nesse contexto, as principais indicações para o transplante de pulmão no mundo nas últimas duas décadas, têm sido: 1) doença pulmonar obstrutiva crônica, em aproximadamente 33% de todos os casos de transplante pulmonar; 2) doenças pulmonares intersticiais ou fibrose pulmonar, em $\cong$ 30% dos casos; 3) em casos de bronquiectasia, principalmente por fibrose cística ($\cong$ 16%); 4) retransplante ($\cong$ 4%); 5) hipertensão arterial pulmonar idiopática ($\cong$ 2,9%); dentre outras (CHAMBERS et al., 2017; YUSEN et al., 2016) (*Figura 1*).

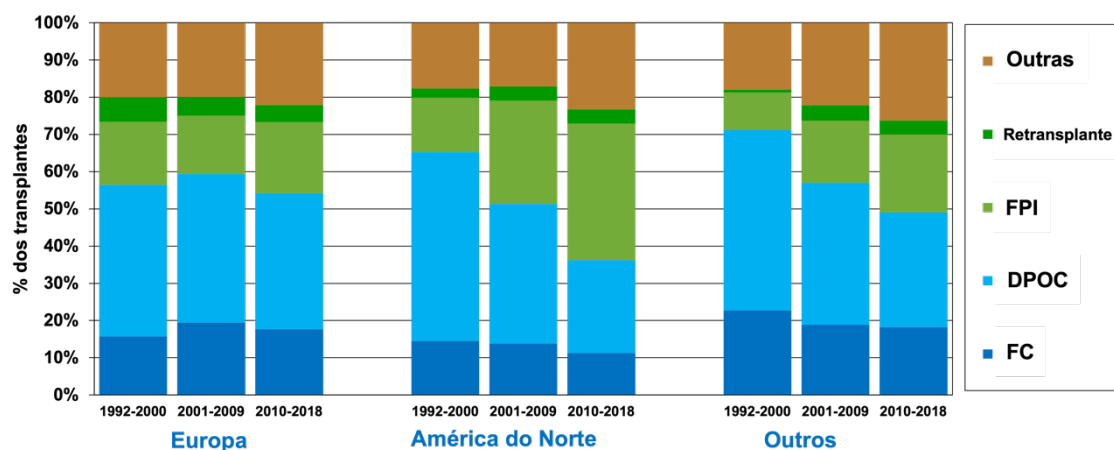
Embora outros diagnósticos de indicações primárias ao transplante de pulmão apresentem baixa incidência, a disseminação do novo coronavírus fomentou as discussões sobre a necessidade do transplante de pulmão como estratégia terapêutica em pacientes com falência pulmonar persistente associada a COVID-19 (BHARAT et al., 2020; CHAMBERS et al., 2017; CYPEL; KESHAVJEE, 2020).

De maneira geral, tem sido preconizado que os candidatos ao transplante pulmonar por síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) relacionada ao SARS-CoV-2 devem preencher os seguintes critérios: 1) serem menores de 65 anos; 2) não apresentar disfunção múltipla de órgãos; 3) esperar de 4-6 semanas após os primeiros sinais clínicos de falência respiratória antes de cogitar o transplante, dando tempo suficiente para a potencial recuperação do pulmão; 4) apresentar evidências radiológicas de doença pulmonar irreversível; 5) o paciente deve estar consciente para discutir as possíveis consequências do procedimento e ser capaz de participar ativamente durante o protocolo de reabilitação; dentre outros (BHARAT et al., 2020; CYPEL; KESHAVJEE, 2020).

As contraindicações ao transplante, por sua vez, podem ser absolutas (histórico de neoplasia, disfunção cardíaca ou de outros órgãos não relacionada à doença pulmonar, tuberculose pulmonar ativa e outras) ou relativas (idade, instabilidade clínica, estado nutricional, doenças sistêmicas associadas, entre

outras), sendo relacionadas tanto a fatores médicos e cirúrgicos, quanto psicossociais (WEILL et al., 2015).

Figura 1 - Distribuição de diagnóstico de receptores adultos por local e ano.



Fonte: Modificado de ISHLT, 2021. FPI, fibrose pulmonar idiopática; DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica; FC, fibrose cística.

2.1.3 Dimensionamento dos transplantes de pulmão

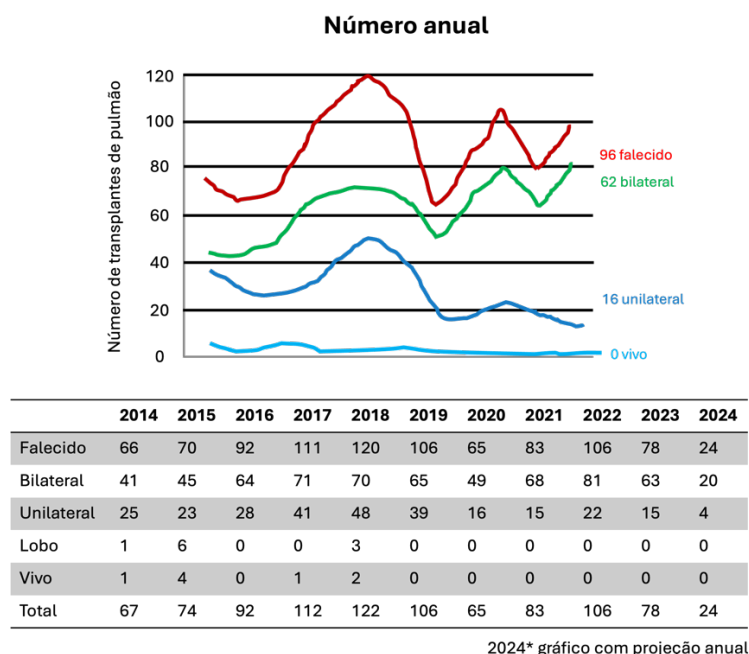
A ampliação dos critérios para indicação ao transplante de pulmão ao longo dos anos, somado a outros fatores comentados anteriormente, favoreceram um aumento exponencial no número de transplantes pulmonares em todo o mundo, ultrapassando a marca de 4000 procedimentos durante o ano de 2015 (CHAMBERS et al., 2017).

A inclusão de novas categorias para o transplante, no entanto, favoreceu um crescimento vertiginoso de pacientes em listas de espera. Até março de 2024, por exemplo, a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) registrou a marca de 164 brasileiros com necessidade estimada de transplantes pulmonares. Apesar da alta demanda, e na contramão dos outros transplantes de órgãos sólidos, os transplantes de pulmão no Brasil foram 37,5% inferior à meta para 2024 (REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES, 2024) (Figura 2).

Entre as possíveis causas para o baixo número de transplantes de pulmão realizados, quando comparado a outros órgãos, destaca-se o possível subfinanciamento da área e a baixa quantidade de pulmões considerados viáveis

para o processo de doação (CHANEY et al., 2014; REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES, 2024).

Figura 2 - Distribuição anual do número de transplantes pulmonares no Brasil.



Fonte: modificado de Registro Brasileiro de Transplantes, 2024.

2.1.4 Critérios para doação de pulmão

Os critérios atuais de seleção de pulmões para doação, baseiam-se ainda nos direcionamentos desenvolvidos na década de 80. Estes direcionamentos classificam como doadores de pulmão ideais, aqueles com idade entre 20 e 45 anos; relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ superior à 350; sem histórico de tabagismo e com radiografia de tórax normal; menos de 5 dias em ventilação mecânica; bacterioscopia sem organismos detectados; ausência de secreções na broncoscopia; e tempo de isquemia menor que 4 horas (CHANEY et al., 2014).

Estes critérios são considerados extremamente rigorosos, o que converge para uma baixa taxa de utilização dos pulmões doados. Desta forma, tendo em vista a crescente demanda para o transplante pulmonar, e a escassez de órgãos para doação, a comunidade científica tem expandido os critérios para doação de pulmões, tornando órgãos que eram previamente considerados inviáveis, em potenciais órgãos para o transplante (CHANEY et al., 2014; MEYER, 2018; PÊGO-FERNANDES et al., 2011).

A ampliação destes critérios, exige, no entanto, diferentes esforços para a melhor compreensão e intervenção frente a possíveis consequências sistêmicas originadas a partir do órgão doado, cuja seleção não atendeu necessariamente a todos os critérios listados. Além disso, tem sido cada vez mais estudada a correlação entre a causa da morte do doador e as repercussões para a função do pulmão destinado à doação (INCI, 2017; MARSHALL, 2001; PÊGO-FERNANDES et al., 2011).

2.2 MORTE ENCEFÁLICA

2.2.1 Definição e epidemiologia

Atualmente, os principais tipos de doações aceitas para transplantes se originam após evento de parada circulatória ou após morte encefálica. Esta última, é responsável por prover a maioria dos órgãos destinados ao transplante, sendo caracterizada pela perda irreversível da função cerebral e do tronco encefálico (CEULEMANS; INCI; VAN RAEMDONCK, 2019; EGAN et al., 2021; JIMÉNEZ-CASTRO; GRACIA-SANCHO; PERALTA, 2015; MARSHALL, 2001; WIJDICKS et al., 2010) (*Figura 3*).

Apesar de apresentar um baixo número relativo quando comparado a outras causas de mortes hospitalares, a incidência da morte encefálica vem crescendo ao longo dos anos, juntamente com a mudança de seu perfil epidemiológico (KRAMER; BAHT; DOIG, 2017; PERIS et al., 2019).

Análises obtidas a partir do *Healthcare Cost and Utilization Project*, apontam que do ano de 2012 a 2016, os eventos de morte encefálica foram responsáveis por um entre cada cinquenta óbitos hospitalares relatados nos Estados Unidos, crescendo de 12.575 para 15.405 casos dentro desse mesmo período (SEIFI; LACCI; GODOY, 2020).

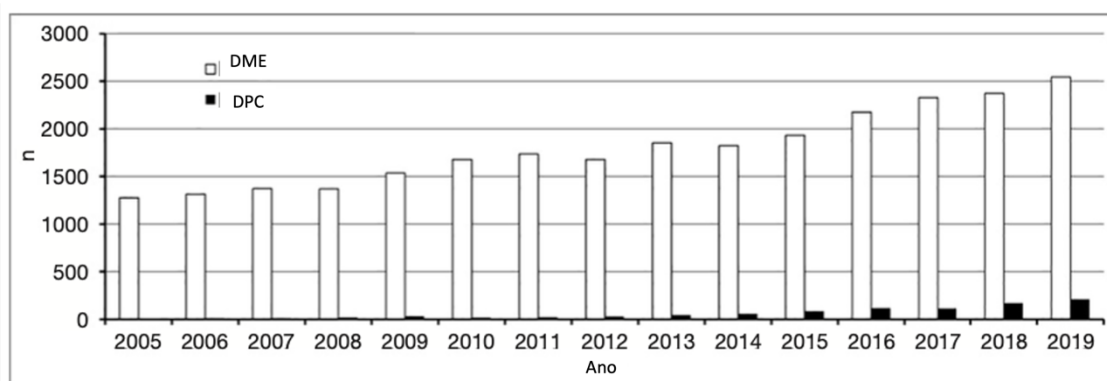
O diagnóstico precoce do evento de morte encefálica, bem como a determinação de suas possíveis causas podem influenciar diretamente o número de pulmões destinados ao processo de doação. Nesse sentido, diferentes centros de pesquisa têm relatado a mudança do perfil das causas de morte encefálica ao longo dos anos, com um aumento significativo dos diagnósticos de lesão cerebral por anoxia em detrimento do número de casos por traumatismo

cranioencefálico (TCE) ou acidente vascular cerebral (AVC) (KRAMER; BAHT; DOIG, 2017; PERIS et al., 2019).

Quando classificados por causa desencadeadora da morte encefálica, os doadores de pulmão por TCE no Canadá (2000-2013) representaram 37% de todos os casos, enquanto lesão cerebral por anoxia, AVC e outros motivos, representaram 26, 32 e 38%, respectivamente (KRAMER; BAHT; DOIG, 2017).

No Brasil, até março de 2024, o maior responsável pelo número de óbitos dos doadores de órgãos foi o AVC, com 519 casos (54%), seguido por TCE (287 casos, 30%), anoxia (63 casos, 7%) e outros (87 casos, 9%) (REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES, 2024).

Figura 3 - Número de doadores de pulmão por ano.



Fonte: Modificado de EGAN et al., 2021. DME, doação após confirmação de morte encefálica; DPC, doação após parada cardiocirculatória.

2.2.2 Complicações decorrentes do evento de morte encefálica

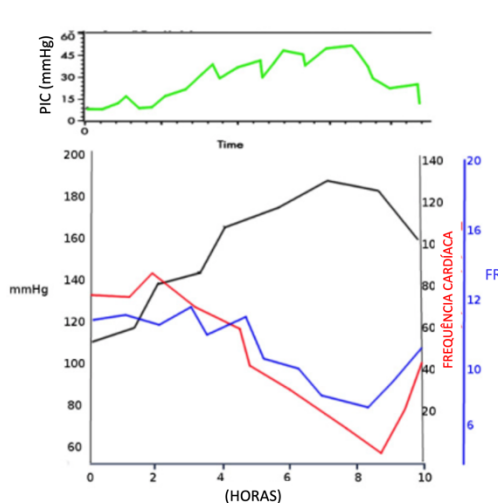
Como comentado anteriormente, o processo de morte encefálica é geralmente causado por eventos de trauma cerebral ou hemorragia cerebrovascular, que cursam com incremento abrupto ou gradual da pressão intracraniana (PIC). O inchaço cerebral e do tronco encefálico, juntamente com o aumento da PIC, favorecerão a interrupção da circulação a este território, convergindo para isquemia e infarto, e, com isso, prejuízo de funções hemodinâmicas, hormonais e inflamatórias (JIMÉNEZ-CASTRO; GRACIA-SANCHO; PERALTA, 2015; MARSHALL, 2001; SMITH, 2004).

Inicialmente, a ocorrência da isquemia pontina promoverá uma estimulação sinérgica do sistema parassimpático e simpático. Essa estimulação reflexa, conhecida como reflexo de Cushing, é caracterizada por bradicardia, hipertensão e alteração do padrão respiratório (*Figura 4*). Com a progressão caudal da isquemia em direção ao bulbo, haverá comprometimento de núcleos vagais, originadores da estimulação parassimpática, o que favorece a superposição da influência simpática (MARSHALL, 2001; NAKAGAWA; TANG, 2011; SMITH, 2004).

O predomínio da estimulação simpática com subsequente incremento da concentração plasmática de diferentes catecolaminas (epinefrina, norepinefrina e dopamina), intensificará o processo de vasoconstrição de diferentes leitos vasculares, convergindo para aumento da resistência vascular, taquicardia e aumento da pressão sanguínea. Finalmente, com a progressão podálica do processo isquêmico, a cadeia paravertebral simpática é comprometida, o que pode levar ao choque hipovolêmico, e, com isso, hipoperfusão de múltiplos órgãos (ESSIEN et al., 2017; MARSHALL, 2001; NAKAGAWA; TANG, 2011; SMITH, 2004).

A abrangência do comprometimento funcional, promovido a partir do processo de morte encefálica, varia de acordo com o órgão estudado. Nesse contexto, os pulmões apresentam-se menos resistentes as perturbações de perfusão, e aos insultos isquêmicos, quando comparado a outros órgãos, o que poderá prejudicar o enxerto destinado ao transplante pulmonar (MICHEL et al., 2018; MORRISON; PITHER; FISHER, 2017; PORTEOUS; LEE, 2017; SMITH, 2004).

Figura 4 - Reflexo de Cushing.



Fonte: Modificado de DINALLO S; WASEEM M., 2022. PIC, pressão intracraniana; FR, frequência respiratória.

2.2.3 Alterações pulmonares decorrentes da morte encefálica

Em decorrência dos eventos listados anteriormente, bem como do comprometimento direto de estruturas hipotalâmicas e hipofisárias, têm sido correlacionadas ao trauma cerebral extenso e/ou morte encefálica, diferentes manifestações fisiopatológicas, variando desde comprometimento miocárdico até disfunções pancreáticas (AVLONITIS et al., 2005; ESSIEN et al., 2017; SMITH, 2004).

Além dessas, as disfunções pulmonares costumam ser bastante relatadas após o diagnóstico de morte encefálica, como evidenciado por Essien e colaboradores (2017), ao demonstrarem que 61,7% de todos os pacientes com critério neurológico de morte admitidos em um centro de trauma evoluíram com SARA de grau moderado à severo (ESSIEN et al., 2017; YOUN; GREER, 2014).

Entre os fatores mais atribuídos à lesão pulmonar após evento de morte encefálica destaca-se a sobrecarga simpática observada durante o incremento da PIC. A tempestade de catecolaminas e a vasoconstrição sistêmica levarão ao aumento da pressão do átrio esquerdo e deslocamento do volume sanguíneo sistêmico para o pulmão, convergindo para aumento da pressão hidrostática pulmonar. O incremento drástico da pressão intravascular pulmonar, por sua vez, favorecerá a descontinuidade do endotélio e aumento da permeabilidade

capilar pulmonar (BUSL; BLECK, 2015; DAVISON; TEREK; CHAWLA, 2012; SMITH, 2004).

Além da superexcitação autonômica, fatores como a sobrecarga volêmica durante a ressuscitação cardiovascular, poderão intensificar o aumento da permeabilidade capilar pulmonar, resultando em extravasamento de exsudato para o espaço alveolar e hemorragia intra-alveolar, observada muitas vezes nas radiografias de tórax como infiltrado alveolar bilateral difuso. Além dos padrões de edema pulmonar, essas alterações fisiopatológicas se manifestam clinicamente com insuficiência respiratória acompanhada por baixo índice de oxigenação (razão P/F) (BUSL; BLECK, 2015; DAVISON; TEREK; CHAWLA, 2012).

Além das alterações hemodinâmicas, a morte encefálica poderá promover a circulação sistêmica de fatores pró-inflamatórios, que ao atingirem os pulmões, contribuem ativamente para lesão do parênquima pulmonar (CATANIA et al., 2009; KOUTSOUKOU, 2016; MCKEATING; ANDREWS; MASCIA, 1998; OTT et al., 1994). Corroborando, diversos autores apontam para o aumento da produção/liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, bem como aumento da expressão de fatores nucleares mediadores de inflamação no território pulmonar após evento de morte encefálica. Somados, estes fatores contribuem para modulação da expressão de moléculas de adesão, aumento da permeabilidade vascular pulmonar, e, finalmente, migração de leucócitos (AVLONITIS et al., 2005; BELHAJ et al., 2017; COBELENS et al., 2010; CORREIA et al., 2020; KALSOTRA et al., 2007; SIMAS et al., 2020; SKRABAL et al., 2005; VAN ZANDEN et al., 2020; WAUTERS et al., 2013; WU et al., 2006) (*Tabela 1*).

Tabela 1 - Alterações inflamatórias do parênquima pulmonar em modelos de lesão cerebral e morte encefálica.

LESÃO, ANIMAL	REPERCUSSÃO PULMONAR	REFERÊNCIA
Morte encefálica, rato	↑ infiltração neutrofílica, CINC-1 e CINC-3 no LBA; ↑ IL-1 β e TNF- α no LBA;	AVLONITIS et al., 2005
Morte encefálica, porco	↑ IL-1 β , IL-6 e TNF- α tecidual; ↑ ICAM-1, MCP-1 e TGF- β tecidual;	SKRABAL et al., 2005

Hemorragia intracerebral, rato	↑ infiltração neutrofílica nos espaços alveolares; ↑ ICAM-1 tecidual;	WU <i>et al.</i> , 2006
Contusão cerebral, rato	↑ infiltração leucocitária nas vias aéreas e espaços alveolares; ↑ LTB4 tecidual;	KALSOTRA <i>et al.</i> , 2007
Hemorragia subaracnóidea, rato	↑ MPO tecidual; ↑ ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina tecidual; ↑ MIP-1 α , MIP-2, TNF- α e CINC-1 tecidual;	COBELENS <i>et al.</i> , 2010
Morte encefálica, camundongo	↑ infiltração neutrofílica e linfocitária no LBA; ↑ IL-6 e IL-10 no LBA;	WAUTERS <i>et al.</i> , 2013
Morte encefálica, porco	↑ MPO tecidual; ↑ expressão gênica para IL-6 na fase inicial da morte encefálica e de IL-10 e IL-8 na fase tardia; ↑ expressão proteica para HO-1 na fase inicial da morte encefálica e de HIF-1 α e na fase tardia; ↑ áreas de apoptose pulmonar;	BELHAJ <i>et al.</i> , 2017
Morte encefálica, rato	↑ infiltração leucocitária no parênquima pulmonar; ↑ áreas de edema e hemorragia no parênquima pulmonar; ↑ ICAM-1 tecidual;	CORREIA <i>et al.</i> , 2020
Morte encefálica, rato	↑ infiltração leucocitária no parênquima pulmonar; ↑ TNF- α e ICAM-1 tecidual; ↓ eNOS tecidual;	SIMAS <i>et al.</i> , 2020
Morte encefálica, rato	↑ expressão gênica para TNF- α , IL-6, VCAM-1, MCP-1 e CINC-1 tecidual; ↑ neutrófilos ativados no parênquima pulmonar;	ZANDEN <i>et al.</i> , 2020
Morte encefálica, rato	↑ infiltração leucocitária no parênquima pulmonar; ↑ MIP-1 α e CINC-1 tecidual; ↑ expressão gênica para VCAM e ICAM tecidual; ↑ expressão gênica e tecidual de IL-1 β ;	RICARDO-DA-SILVA <i>et al.</i> , 2021

Fonte: Próprio Autor. CINC-1, quimioatraente de neutrófilos induzido por citocinas-1; CINC-3, quimioatraente de neutrófilos induzido por citocinas-3; HIF-1 α , fator induzido por hipóxia-1 α , HO-1, heme oxigenase 1; ICAM-1, molécula de adesão intercelular-1; IL-1, interleucina 1; IL-10, interleucina 10; IL-1 β , interleucina 1 β ; IL-6, interleucina-6; LTB4, leucotrieno B4; MCP-1, quimioatraente de monócitos-1; MIP-1 α , proteína inflamatória de macrófagos-1 α ; MIP-2, proteína inflamatória de macrófagos-2; MPO, mieloperoxidase; TGF- β , fator de crescimento tecidual- β ; TNF- α , fator de necrose tumoral- α .

2.2.4 Modelos animais de morte encefálica

Estudos epidemiológicos apontam para o crescente número de diagnósticos e mudança de perfil dos eventos de morte encefálica ao redor do mundo (KRAMER; BAHT; DOIG, 2017; PERIS et al., 2019; SEIFI; LACCI; GODOY, 2020). Em posse desta realidade, frente a questões éticas e de logística, bem como na busca de fatores etiológicos das complicações associadas ao evento de morte encefálica e seus impactos para a viabilidade dos potenciais órgãos destinados a doação, tornou-se importante o desenvolvimento de modelos animais de morte encefálica, para o estudo prospectivo dos mecanismos patológicos, história natural do evento, na procura de novos alvos terapêuticos para otimizar o número de enxertos viáveis, bem como na reavaliação de tratamentos clássicos (KOLKERT et al., 2007; PRATSCHKE; NEUHAUS; TULLIUS, 2005; SEIFI; LACCI; GODOY, 2020).

Diversos modelos animais de morte encefálica têm sido utilizados para estudar o impacto das condições patológicas deste evento na qualidade do órgão destinado a doação. Nesse sentido, a maioria dos modelos procuram mimetizar o aumento da PIC e seus efeitos subsequentes, por meio da inserção e insuflação de cateter intracraniano (FLOERCHINGER; TILNEY; TULLIUS, 2013; SANA VILELA et al., 2024; VAN ZANDEN et al., 2020).

Para a confirmação do aumento da PIC no estabelecimento da morte encefálica, diversas linhagens animais podem ser utilizadas, tais como de macacos, coelhos, ratos e camundongos. Apesar de todos reproduzirem (em maior ou menor grau) os efeitos da morte encefálica após insuflação do cateter, os modelos mais bem estudados e difundidos utilizam-se de roedores, seja por mimetizar sinais e sintomas advindos do aumento da PIC, seja pelo mais fácil acesso e menor custo do modelo (BELHAJ et al., 2017; FLOERCHINGER; TILNEY; TULLIUS, 2013; KOLKERT et al., 2007; LÓPEZ-AGUILAR et al., 2005; POMPER et al., 2010; VAN ZANDEN et al., 2020).

Diferentes metodologias de morte encefálica podem ser geradas a partir da insuflação do cateter, como o modelo de indução gradual, alcançado pela lenta e gradativa insuflação do cateter intracraniano com aumento cadenciado da PIC ($\cong$ 30 min.) e o modelo de indução abrupta, alcançado pela insuflação

rápida do cateter intracraniano e aumento súbito da PIC ($\cong$ 30-60 seg.) (KOLKERT et al., 2007; VAN ZANDEN et al., 2020).

Enquanto o modelo de indução gradual da morte encefálica reproduz melhor as alterações clínicas que decorrem do aumento lento e progressivo da PIC, tais como as resultantes de processo hemorrágico intracraniano, o modelo de indução abrupta mimetiza situações de trauma cerebral agudo e extenso. A metodologia de insuflação, por sua vez, irá produzir alterações de maior ou menor amplitude, com o incremento gradual da PIC promovendo alterações hemodinâmicas mais brandas durante o período após a insuflação do cateter, e a insuflação rápida promovendo alterações drásticas com maior comprometimento do parênquima pulmonar (KOLKERT et al., 2007; VAN ZANDEN et al., 2020).

Após confirmada pela observação do aumento da PIC, ausência de fluxo sanguíneo encefálico e de reflexos, midríase bilateral e apneia, tem sido descrito o emprego de diferentes intervalos de tempo na manutenção da morte encefálica. Com as primeiras alterações fisiopatológicas manifestando-se a partir de 3 horas após a indução da morte, e devido aos episódios de hipotensão, necessidade da administração de drogas vasoativas e aumento de eventos de parada cardiocirculatória, os protocolos mais amplamente utilizados são os de 4 a 6 horas, com as dificuldades para manutenção do sistema cardiovascular aumentando proporcionalmente com o tempo decorrido após a insuflação do cateter (BELHAJ et al., 2017; KOLKERT et al., 2007; LÓPEZ-AGUILAR et al., 2005; POMPER et al., 2010; VAN ZANDEN et al., 2020; WAUTERS et al., 2013).

2.3 PNEUMONITE ASPIRATIVA

2.3.1 Definição e epidemiologia

Além dos processos deletérios relacionados diretamente aos eventos de morte encefálica, outros fatores contribuem para o baixo número de órgãos considerados viáveis para o transplante. Entre estes fatores, destaca-se a pneumonite ocasionada por aspiração de conteúdo gástrico (MEERS et al., 2010; PUNCH et al., 2007).

A pneumonite aspirativa é definida como lesão pulmonar aguda (LPA) decorrente de inalação de conteúdos orofaríngeos ou gástricos para o interior do trato respiratório inferior, e é ocasionada por complicações associadas a anestesia geral, TCE, AVCs, além de outras condições que cursam com alteração do estado de consciência (MARIK, 2001; RAGHAVENDRAN et al., 2011).

O caráter silencioso da aspiração de conteúdo gástrico e a baixa especificidade de marcadores bioquímicos, dificultam o rastreamento e padronização das condutas terapêuticas associadas a pneumonite aspirativa. Apesar disso, estudo prospectivo realizado por Metheny et al. (2006) demonstrou que a maioria (88,9%) dos pacientes críticos participantes apresentaram ao menos um episódio aspirativo. Esses episódios impactam diretamente na qualidade dos órgãos destinados a doação, como apontam Meers et al. (2010), ao demonstrarem que em seu centro transplantador, a aspiração de conteúdo gástrico esteve em quarto lugar entre as principais causas de não aceitação dos pulmões doados.

2.3.2 Alterações pulmonares decorrentes do evento de aspiração de conteúdo gástrico

A aspiração de conteúdo gástrico resulta em injúria do epitélio da árvore traqueobrônquica e parênquima pulmonar, convergindo para intensa pneumonite química. Esta injúria apresenta um comportamento bifásico, onde as primeiras duas horas após a aspiração são marcadas pela estimulação de neurônios sensíveis a capsaicina e ações diretas do baixo pH no epitélio respiratório. A segunda fase, por sua vez, geralmente ocorre entre o intervalo de 4 a 6 horas, e é caracterizada por infiltração neutrofílica para o interior dos alvéolos e interstício. Estes fatores combinados favorecerão a liberação de diferentes mediadores inflamatórios, expressão de moléculas de adesão e intensa liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KENNEDY et al., 1989; MARIK, 2001; RAGHAVENDRAN et al., 2011).

Os eventos acima listados levam a perda de integridade da microvasculatura pulmonar, com comprometimento da função do surfactante e extravasamento de exsudato para o interior dos alvéolos e vias aéreas,

resultando em deterioração da mecânica e função pulmonar (FOLKESSON et al., 1995; MARIK, 2001; NADER-DJALAL et al., 1998).

As repercussões pulmonares da aspiração de conteúdo gástrico mais recorrentes na literatura são detalhadas na *Tabela 2*.

Tabela 2 - Repercussões pulmonares associadas aos modelos de aspiração de conteúdo gástrico.

LESÃO, ANIMAL	REPERCUSSÃO PULMONAR	REFERÊNCIA
Instilação de ácido clorídrico, rato	↑ permeabilidade pulmonar; ↑ neutrófilos e eritrócitos intra-alveolares tecidual;	(KENNEDY et al., 1989)
Instilação de ácido clorídrico, rato	↑ permeabilidade pulmonar; ↑ proteína total no LBA; ↑ edema pulmonar;	(GOLDMAN et al., 1990)
Instilação de ácido clorídrico, rato	↑ permeabilidade pulmonar; ↑ atividade de proteases no LBA;	(KNIGHT et al., 1992)
Instilação de ácido clorídrico, coelho	↑ diferença arterio-alveolar de oxigênio; ↑ PIP; ↑ edema pulmonar; ↑ IL-8 no LBA;	(FOLKESSON et al., 1995)
Instilação de ácido clorídrico, rato	↑ EROs e TBARS tecidual;	(NADER-DJALAL et al., 1998)
Instilação de ácido clorídrico, rato	↑ permeabilidade pulmonar; ↓ razão P/F; ↑ infiltração neutrofilica;	(DAVIDSON et al., 1999)
Instilação de ácido clorídrico e/ou conteúdo gástrico, rato/coelho	↑ expressão de MIP-2 tecidual e no LBA; ↑ permeabilidade pulmonar; ↓ razão P/F;	(SHANLEY et al., 2000)
Instilação de ácido clorídrico, rato	↑ razão peso pulmão/peso corpóreo; ↑ proteína total no LBA;	(PUIG et al., 2016)
Instilação de ácido gástrico, porco	↓ Csta; ↑ resistência vascular pulmonar;	(NAKAJIMA et al., 2017)
Instilação de ácido clorídrico, rato	↑ edema pulmonar; ↑ infiltração leucocitária no LBA após 4 h da instilação; ↑ IL-6, MIP-2 e IL-10 no LBA a partir de 4 h da instilação; ↓ pO2 sistêmico; ↓ perfusão pulmonar;	(SETZER et al., 2018)
Instilação de ácido gástrico, porco	↓ VC e Cdyn; ↓ razão P/F;	(ABDELNOUR-BERCHTOLD et al., 2022)
Instilação de ácido clorídrico, camundongo	↓ expressão de ECA2 tecidual; ↑ edema pulmonar; ↑ elastância e resistência pulmonar; ↑ score de lesão pulmonar;	(MINATO et al., 2022)

↑ IL-1 β , IL-6 e TNF- α tecidual;
 ↑ CXCL1, CXCL2 e CXCL10 tecidual;

Fonte: Próprio Autor. EROs, espécies reativas ao oxigênio; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PIP, pressão inspiratória de pico; IL-8, interleucina 8; IL-6, interleucina 6; MIP-2, proteína inflamatória de macrófagos-2; IL-10, interleucina 10; Csta, complacência estática; VC, volume corrente; Cdyn, complacência dinâmica; razão P/F, razão PaO₂/FiO₂; LBA, lavado broncoalveolar; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; IL-1 β , interleucina 1 β ; TNF- α , fator de necrose tumoral- α ; CXCL1, ligante de quimiocina 1; CXCL2, ligante de quimiocina 2; CXCL10, ligante de quimiocina 10.

2.3.3 Modelos animais de pneumonite aspirativa

Com base no comentado, e tendo em vista o caráter silencioso dos eventos aspirativos que contribuem para a LPA, tornou-se importante o desenvolvimento de modelos animais que simulem a fisiopatologia das diferentes etapas associadas a pneumonite aspirativa, bem como o desenvolvimento de biomarcadores e novos alvos ou condutas terapêuticas que reduzam o número de pulmões rejeitados por LPA associada a aspiração de conteúdo gástrico (RAGHAVENDRAN et al., 2011; SETZER et al., 2018).

Diversos modelos e linhagens animais de pneumonite aspirativa têm sido utilizados para o estudo desta condição na qualidade do órgão destinado a doação. Os estudos concentram-se em simular os efeitos isolados da aspiração de ácido, de partículas alimentares gástricas, ou mesmo pela combinação desses dois fatores (RAGHAVENDRAN et al., 2011).

Nesse sentido, diferentes metodologias podem ser geradas a partir da instilação intratraqueal de ácido clorídrico (HCl). Estas costumam considerar o pH, concentração, volume da solução e/ou tempo de acompanhamento após estabelecimento do modelo. De maneira geral, os estudos administram soluções de HCl à 0.1N com pH ajustado entre 1 – 2, em volumes que variam de 1 a 4 mL/kg (CHIMENTI et al., 2020; KENNEDY et al., 1989; MARIK, 2001; REISS; UHLIG; UHLIG, 2012; SETZER et al., 2018).

A instilação de ácido no interior das vias aéreas costuma ser acompanhada por sintomas transientes de piloereção e taquipneia, com baixo índice de mortalidade (SETZER et al., 2018). As lesões induzidas, por sua vez, apresentam efeito bifásico, com as primeiras manifestações fisiopatológicas manifestando-se a partir das primeiras horas pós-instilação (RAGHAVENDRAN et al., 2011). Corroborando, Setzer e colaboradores (2018) apontam para redução da perfusão e aumento do edema pulmonar a partir dos primeiros momentos pós-instilação, com consequente redução de função pulmonar. Passadas algumas horas (24 a 168) da administração do ácido estes parâmetros tendem a retornar para os valores prévios a injúria. Em contrapartida, o reestabelecimento da função pulmonar costuma ser acompanhado por leucocitose tardia, bem como por incremento nos níveis de citocinas teciduais e no lavado bronco-alveolar (LBA) (MARIK, 2001; RAGHAVENDRAN et al., 2011; SETZER et al., 2018).

2.4 DISFUNÇÃO PRIMÁRIA DO ENXERTO (DPE)

2.4.1 Fisiopatologia da DPE

2.4.1.1 Lesão por isquemia-reperfusão na DPE

Os fatores que convergem para o desencadeamento da morte encefálica, bem como as repercussões fisiopatológicas associadas a progressão temporal dessa condição, infligirão ao enxerto pulmonar múltiplos fatores deletérios. Além da relação com o tipo/causa do óbito, as condições nas quais o enxerto pré-transplante estará submetido, tais como tempo de ventilação mecânica invasiva e formas de suprimento e armazenamento dos pulmões, contribuirão para o desenvolvimento da disfunção primária do enxerto (DPE) (DE PERROT et al., 2003; MORRISON; PITHER; FISHER, 2017; PORTEOUS; LEE, 2017).

Caracterizada pela manifestação de baixo índice de oxigenação (razão PaO_2/FiO_2 ou P/F) e presença de infiltrado inflamatório bilateral consistente com edema pulmonar de origem não cardiogênica, a DPE é uma forma de lesão pulmonar aguda que ocorre nas primeiras horas após a reperfusão do enxerto, estando associada a uma alta taxa de morbimortalidade na população

transplantada (*Tabela 3*) (DIAMOND et al., 2013; MORRISON; PITHER; FISHER, 2017; PORTEOUS; LEE, 2017; SHAH; DIAMOND, 2018; SNELL et al., 2017).

Segundo o Consenso de 2016 da Sociedade Internacional para o Transplante de Coração e Pulmão (ISHLT), a severidade da DPE varia entre três principais graus (*Tabela 3*) e deve ser acessada em quatro tempos distintos (T0, T24, T48 e T72 horas), contados a partir do início da reperfusão do pulmão transplantado (SNELL et al., 2017).

Tabela 3 - Definição e graus de severidade da DPE segundo a Sociedade Internacional para o Transplante de Coração e Pulmão (2016).

Graus de severidade da DPE da Sociedade Internacional de Transplante de Coração e Pulmão (2016)		
GRAU	EDEMA PULMONAR NO RAIO-X	RAZÃO P/F
DPE grau 0	Não	Qualquer
DPE grau 1	Sim	> 300
DPE grau 2	Sim	200 a 300
DPE grau 3	Sim	< 200

Fonte: Adaptado de SNELL et al., 2017. DPE, disfunção primária do enxerto.

Apesar de convencionalmente graduados a partir do início da reperfusão do pulmão, os mecanismos deflagradores da DPE iniciam-se ainda durante o período isquêmico no qual o enxerto estará submetido. Somados, estes dois eventos protagonizam a resposta oxidativa e inflamatória observada na lesão por isquemia-reperfusão (LIR), e constituem a base vigente da etiologia da DPE (MORRISON; PITHER; FISHER, 2017; PORTEOUS; LEE, 2017).

A interrupção da perfusão sanguínea durante o processo de captação, armazenamento e preparo do enxerto para o transplante pulmonar favorecerá o estabelecimento de evento isquêmico, com subsequente hipóxia tecidual. A diminuição ou mesmo a depleção dos níveis de oxigênio, juntamente com a ausência de estímulo mecânico nas paredes dos vasos pulmonares, contribuirão para geração de EROs a partir de macrófagos alveolares, células endoteliais e

outras células imunológicas (DE PERROT et al., 2003; DEN HENGST et al., 2010; HAMILTON et al., 2017; MORRISON; PITHER; FISHER, 2017; PORTEOUS; LEE, 2017).

Com a redução do estresse de cisalhamento na parede dos vasos pulmonares, o estabelecimento da hipóxia tecidual e a consequente redução dos níveis de adenosina trifosfato (ATP), haverá o fechamento de canais de potássio sensíveis ao ATP. Localizados na membrana das células endoteliais, esses canais regulam o potencial de membrana dessas células, e, uma vez na conformação fechada, diminuem o efluxo de K^+ . O aumento da concentração desse cátion e a despolarização de membrana decorrentes desse processo, favorecerão o aumento da expressão/atividade da enzima NADPH oxidase, com subsequente aumento da produção de EROs (DE PERROT et al., 2003; DEN HENGST et al., 2010; MORRISON; PITHER; FISHER, 2017; PORTEOUS; LEE, 2017).

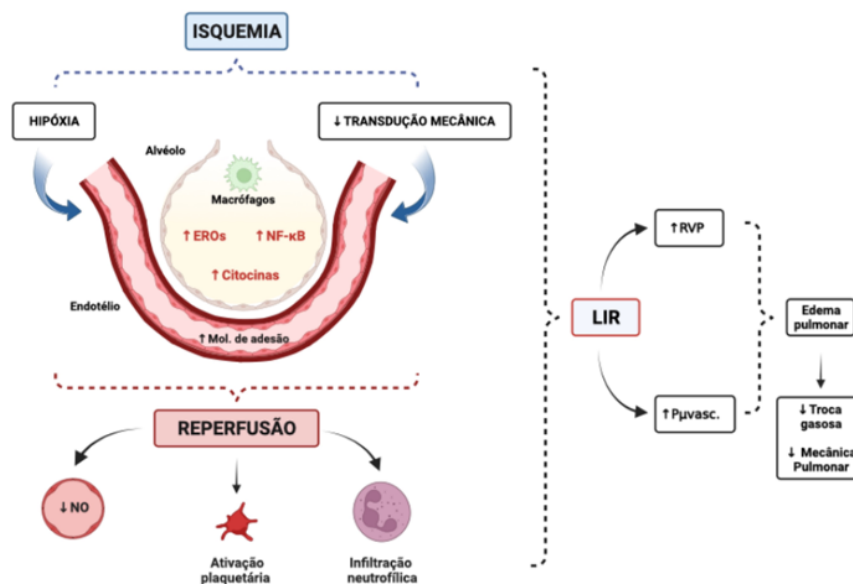
A depleção dos níveis de ATP irá contribuir, ainda, para diminuição do potencial de membrana das mitocôndrias, permitindo o escape de íons Ca^{2+} , deflagração de processo apoptótico e produção de radicais livres. Somadas a essas duas fontes de EROs e a produção a partir de macrófagos alveolares, o evento isquêmico promoverá ainda conversão da enzima xantina desidrogenase (localizada no endotélio pulmonar e pneumócitos do tipo II) em xantina oxidase, prejudicando a conversão normal de hipoxantina (molécula final da quebra do ATP) em ácido úrico, resultando no aumento do conteúdo de espécies reativas (DE PERROT et al., 2003; MORRISON; PITHER; FISHER, 2017; PORTEOUS; LEE, 2017).

Além das EROs, as células endoteliais e macrófagos irão participar ainda da regulação da atividade de diferentes enzimas, proteases e fatores pró-inflamatórios durante a fase isquêmica, tais como: fator nuclear κB (NF- κB) e citocinas pró-inflamatórias (IL-8; IL-12; IL-18; TNF- α). A ativação dos componentes citados, promoverá, em última instância, aumento da expressão de moléculas de adesão de superfície nas células endoteliais pulmonares (CD18; ICAM-1; P-selectina), contribuindo para a adesão leucocitária durante a fase de reperfusão (DE PERROT et al., 2003; DEN HENGST et al., 2010; HAMILTON et al., 2017; MORRISON; PITHER; FISHER, 2017; PORTEOUS; LEE, 2017).

Com o reestabelecimento da perfusão do enxerto isquêmico, haverá recrutamento massivo de neutrófilos, que convergirão para prolongamento da resposta oxidativa e inflamatória (liberação de citocinas, elastases e proteases) do território pulmonar, que juntamente com a sinalização das plaquetas e a baixa biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), contribuirão para o dano da vasculatura pulmonar, representados pelo aumento de resistência e da permeabilidade vascular pulmonar (DE PERROT et al., 2003; MORRISON; PITHER; FISHER, 2017; PORTEOUS; LEE, 2017).

A alteração dos gradientes pressóricos transmuralis e o aumento de permeabilidade da microvasculatura contribuem para formação de edema intersticial, com consequente comprometimento do processo de hematose e da função pulmonar, observados através da diminuição no índice de oxigenação, aumento do espaço morto ventilado, do trabalho elástico (diminuição da produção de surfactante por comprometimento de células alveolares do tipo II), dentre outros (DE PERROT et al., 2003; MORRISON; PITHER; FISHER, 2017; PORTEOUS; LEE, 2017) (*Figura 5*).

Figura 5 - Alterações fisiopatológicas durante a lesão por isquemia-reperfusão pulmonar.



Fonte: Adaptado de DEN HENGST et al., 2010. Elaborado com BioRender.com. EROs, espécies reativas de oxigênio; NF-κB, fator nuclear-κB; NO, óxido nítrico; LIR, lesão por isquemia-reperfusão; RVP, resistência vascular pulmonar; Pμvasc, permeabilidade microvascular.

2.4.2 Modelos animais de isquemia-reperfusão

Com o objetivo de mimetizar as alterações bioquímicas, celulares e moleculares observadas durante o desenvolvimento da DPE, tem sido proposto o desenvolvimento de diferentes metodologias e modelos animais que simulam o evento de isquemia-reperfusão pulmonar. Essas simulações envolvem desde experimentos *in vitro* até modelos ortotópicos de transplante pulmonar (LAMA et al., 2017).

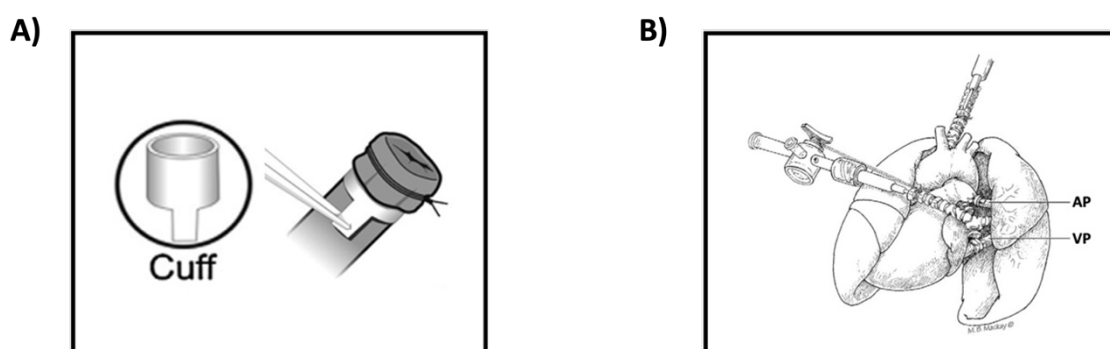
Nesse contexto, vários autores têm avaliado o comportamento de diferentes células do território pulmonar à hipóxia aguda, seguida pela rápida reintrodução de oxigênio nas culturas celulares. Apesar da possibilidade de avaliar o comportamento das células em ambiente controlado e de baixo custo, os ensaios *in vitro* não contemplam os múltiplos fatores sistêmicos e locais associados à LIR (LAMA et al., 2017; MCCOURTIE et al., 2008; SHARMA et al., 2007; WOJCIAK-STOTHARD; TSANG; HAWORTH, 2005).

Desta maneira, modelos que consideram diferentes componentes da LIR passaram a ser estudados e propostos, como os modelos *in vivo* de oclusão hilar unilateral e o modelo ortotópico de transplante pulmonar. Apesar de sua complexidade, o modelo de transplante pulmonar é preferível visto a melhor representação dos eventos precoces antígeno-independentes, e pela possibilidade de estudar a evolução temporal dos efeitos da isquemia fria sobre o enxerto pulmonar (ABDELNOUR-BERCHTOLD et al., 2022; ISKENDER et al., 2018; LAMA et al., 2017; OHSUMI et al., 2020; SAITO et al., 2020; WANG et al., 2021).

Inicialmente descrita nos anos 70, a metodologia de transplante pulmonar em ratos passou a ser amplamente utilizada, visto o baixo custo quando comparado a modelos animais de maior porte e devido a possibilidade do uso de linhagens isogênicas. Apesar de suas dificuldades, e com o advento da técnica dos *cuffs* desenvolvida por Mizuta e colaboradores (1989), o modelo ortotópico tem permitido menores tempos de isquemia quente, boa função do enxerto após o transplante e reprodutibilidade da técnica (MIZUTA et al., 1989; ZHAI et al., 2008) (Figura 6A).

A despeito dos avanços conquistados, diversos autores vêm propondo alterações da técnica de transplante em ratos, objetivando desde a facilitação durante o implante dos *cuffs* até a coleta de dados e melhora da ventilação do pulmão transplantado (GUO et al., 2013; SANTANA RODRÍGUEZ et al., 2011; TIAN et al., 2020; ZHAI et al., 2008). Nesse sentido, De Perrot e colaboradores (2005) propuseram a ventilação independente do enxerto pulmonar, visto que quando associada ao pulmão nativo, a função pulmonar poderia ser contralateralmente compensada e as análises de mecânica pulmonar, falseadas. Além disso, a ventilação de ambos os pulmões dificulta a coleta de amostras, como do lavado bronco-alveolar (LBA), e os ajustes individualizados para o pulmão transplantado (DE PERROT et al., 2005) (*Figura 6B*).

Figura 6 - Modelo ortotópico de transplante pulmonar em ratos.



A) Técnica dos cuffs para anastomose; B) Posição do pulmão esquerdo e da traqueia do doador para reperusão e ventilação independente do pulmão transplantado. Fonte: Adaptado de DE PERROT et al., 2005; SANTANA RODRÍGUEZ et al., 2011. AP, artéria pulmonar; VP, veia pulmonar.

2.5 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)

Ao longo dos anos, a participação dos diferentes componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) tem recebido grande atenção, devido sua contribuição chave no processo patogênico da injúria pulmonar, seja na modulação da resposta inflamatória, oxidativa, fibrótica ou pressora (GEARA et al., 2009; NATAATMADJA et al., 2014).

O SRA está presente em múltiplos sistemas e órgãos, e consiste em duas principais vias, uma clássica e uma protetora (*Figura 7*). A via clássica é

responsável pela formação de angiotensina II (Ang II), a partir do precursor renina e da conversão de angiotensina I em Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Este octapeptídeo exerce inúmeras atividades biológicas, grande parte delas mediadas pelos receptores para angiotensina do tipo I (*AT1R*). Além de regular os níveis pressóricos de diferentes leitos vasculares, a Ang II atua, também, como mediador pró-inflamatório e fibrótico (LIU et al., 2009; QARADAKHI et al., 2020; SANTOS et al., 2018).

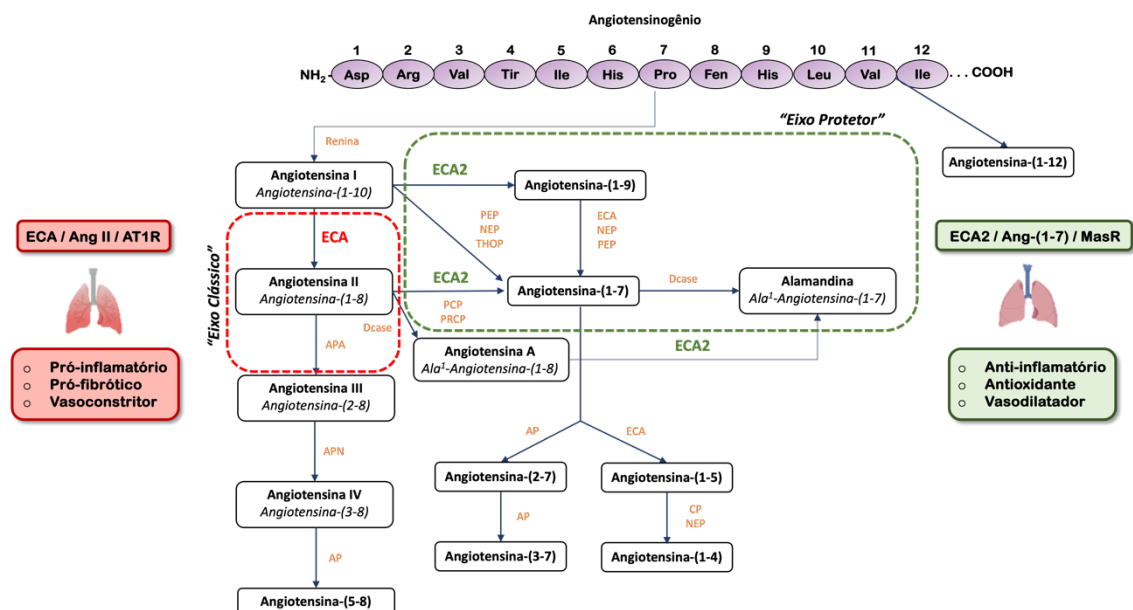
Corroborando, diversos autores relacionam o aumento da atividade do SRA com o comprometimento associado a vasculopatia do enxerto cardíaco e renal, além de sua participação na LPA em pacientes submetidos ao transplante pulmonar, que, devido ao incremento prematuro dos níveis plasmáticos e/ou teciduais de Ang II, acompanhados por incremento da atividade relacionada ao NF- κ B, TNF- α , e da adesão e infiltração leucocitária no parênquima pulmonar, poderá favorecer o remodelamento patológico das células epiteliais bronquiolares, e, com isso, a DPE (ANTUS et al., 2006; LIU et al., 2009; NATAATMADJA et al., 2014; YOUSUFUDDIN; YAMANI, 2004; ZHAO et al., 2018).

A via não clássica (eixo protetor) do SRA, por sua vez, compreende a conversão da Ang II em Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] pela ECA isoforma 2 (ECA2), esta enzima é responsável ainda pela formação de Angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)] e pela produção de alamandina. Estes peptídeos têm apresentado diferentes efeitos vaso e cardioprotetores, seja por atuar indiretamente, diminuindo a biodisponibilidade de Ang II, ou por ação direta em seus respectivos receptores (*MasR*, *AT2R* e *MrgD*), favorecendo a regulação do tônus miogênico e do processo de remodelamento vascular (DE SOUZA-NETO et al., 2018; QARADAKHI et al., 2020; SANTOS et al., 2018; SCHLEIFENBAUM, 2019; SIMÕES E SILVA et al., 2013).

Antes de comentar os efeitos destes peptídeos no sistema pulmonar, é importante ressaltar, que, há cerca de 20 anos não havia sequer evidências sobre a expressão de ECA2 nos pulmões (DONOGHUE et al., 2000). Atualmente, no entanto, existem fortes evidências da expressão desta enzima tanto por células epiteliais de vias aéreas, como por células alveolares do tipo I e do tipo II, fibroblastos, macrófagos alveolares e por células do endotélio pulmonar (ZHANG; LI; NIU, 2020).

Nesse sentido, diversos estudos têm apontado o papel central da ECA2 na fisiopatologia das doenças cerebrovasculares, pulmonares e na função do endotélio pulmonar, como confirmado por algumas das evidências a seguir: 1) o aumento da expressão/atividade da ECA2 atenua a produção de EROs e o comprometimento encefálico em modelo animal de isquemia cerebral; 2) pacientes com fibrose pulmonar idiopática apresentam menor expressão de ECA2 em biópsia pulmonar; 3) modelos animais de fibrose pulmonar induzida e hipertensão pulmonar estão associados com diminuição da atividade da ECA2; 4) animais *knockout* para ECA2 exibem SARA; 5) animais *knockout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) apresentam maior agravamento da resposta inflamatória observada na asma crônica; 6) o aumento da expressão/atividade da ECA2 atenua a produção de citocinas inflamatórias, e reduz o efeito vasoconstritor, proliferativo e fibrótico promovidos por modelo animal de hipertensão pulmonar; 7) o desequilíbrio entre o eixo clássico (ECA/Ang II/AT1R) e o protetor (ECA2/Ang-(1-7)/MasR) do SRA durante o desenvolvimento da COVID-19 favorece o estabelecimento de disfunção pulmonar; 8) B38-CAP, uma carboxipeptidase semelhante a ECA2 derivada de bactérias, apresentou efeito anti-inflamatório e potencializador da função pulmonar em modelo de LPA induzida por sepse e aspiração de conteúdo gástrico (FERREIRA et al., 2009; LANZA et al., 2020; MAGALHÃES et al., 2016; MINATO et al., 2022; SIMÕES E SILVA et al., 2013; VALLE MARTINS et al., 2021; YAMAZATO et al., 2009; ZHANG; LI; NIU, 2020; ZHENG et al., 2014).

Figura 7 - Diagrama esquemático dos eixos clássico (vermelho) e protetor (verde) do sistema renina-angiotensina (SRA) no pulmão.



Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2018. Elaborado com BioRender.com.; ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; APA, aminopeptidase A; APN, aminopeptidase N; PRCP, prolil endopeptidase; PCP, prolilcarboxiendopeptidase; NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolil endopeptidase; CP, carboxipeptidase; AP, aminopeptidase; Dcase, decarboxilase; THOP, thimet oligopeptidase; Ang I, angiotensina I; Ang II, angiotensina II; Ang-(1-7), angiotensina-(1-7); AT1R, receptor para Ang II tipo 1; MasR, receptor para Ang-(1-7).

2.5.1 Ativadores do eixo protetor do SRA

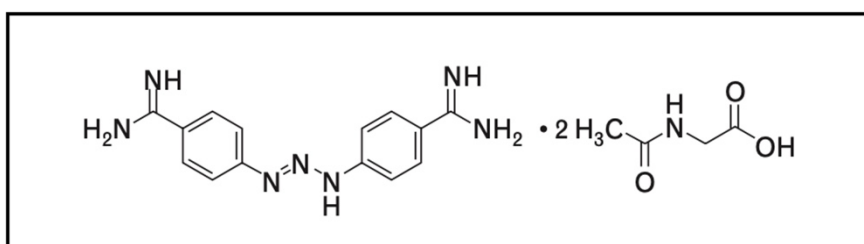
A partir do comentado, e com o redirecionamento das hipóteses acerca do papel da ECA2 no processo fisiopatológico pulmonar, novas abordagens experimentais preventivas e terapêuticas passaram a ser estudadas, como a administração de Ang-(1-7) e alamandina, que apresentam resultados eficazes na redução de citocinas inflamatórias, de fatores de crescimento relacionados ao processo fibrótico e diminuição da infiltração celular em diferentes patologias de origem respiratória (CAO et al., 2019; DE CARVALHO SANTUCHI et al., 2019; EL-HASHIM et al., 2012; FERREIRA et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2015; MAGALHAES et al., 2018; SANTOS et al., 2018; SHENOY et al., 2010; SIMÕES E SILVA et al., 2013).

Além da utilização de produtos finais do eixo protetor do SRA, tem sido proposta a utilização de ativadores da ECA2, tais como a xantenona (XT) e o aceturato de diminazeno (DIZE), na regulação de processos patológicos pulmonares (DHAWALE et al., 2016; FANG; GAO; LIU, 2019).

Descrito em 1955, o DIZE é um composto aromático de diamidina com peso molecular de 515.52 g/mol, cor amarelada e com a seguinte estrutura química $C_{14}H_{15}N_7 \cdot 2C_4H_7NO_3$ (Figura 8). Utilizado inicialmente como medicamento antiparasitário, o DIZE tem despertado atenção de diferentes grupos de pesquisa, devido seus efeitos estimulatórios sobre a ECA2 (QARADAKHI et al., 2020; VELKOSKA; PATEL; BURRELL, 2016).

Além dos cardioprotetores, os efeitos do DIZE na prevenção/tratamento de complicações respiratórias já demonstrados, incluem: atividade anti-inflamatória e anti-fibrótica em modelo experimental de asma (DHAWALE et al., 2016); efeito hipotensor e de potencialização da função de células progenitoras angiogênicas em modelo de hipertensão pulmonar (SHENOY et al., 2013); efeito anti-inflamatório e antioxidante em modelo de injúria pulmonar induzida por hiperóxia, envolvendo a inibição da via NF- κ B (FANG; GAO; LIU, 2019); efeito inibitório na transição epitélio-mesenquimal em modelo animal de silicose (LI et al., 2020); e mais recentemente apresentou efeito pneumoprotetor em modelo de oclusão hilar unilateral, envolvendo a inibição da via da ADAM-17 (WANG et al., 2021).

Figura 8 - Estrutura química do aceturato de diminazeno (DIZE).



Fonte: VELKOSKA; PATEL; BURRELL, 2016.

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

Apesar do aumento progressivo do número de diagnósticos de morte encefálica ao longo dos anos e a ampliação dos critérios para indicação ao transplante pulmonar, os institutos especializados vêm observando um aumento exponencial do número de pacientes em listas de espera, bem como a estagnação do número de órgãos disponíveis para o transplante. Entre os possíveis motivos para os eventos listados estão as mudanças do perfil epidemiológico e a deficiência na padronização no diagnóstico da morte encefálica, além dos eventos de aspiração de conteúdo gástrico associado a este evento (CHAMBERS et al., 2017; KRAMER; BAHT; DOIG, 2017; MARIK,

2001; PERIS et al., 2019; RAGHAVENDRAN et al., 2011; REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES, 2023).

Visto que os diferentes eventos deflagradores da morte encefálica e da pneumonite aspirativa impactam de maneira particularizada o enxerto pulmonar, e correlacionam-se diretamente com os eventos de DPE, torna-se salutar o investimento nestas áreas de conhecimento, objetivando a maior compreensão dos eventos fisiopatológicos associados ao transplante pulmonar, para alcance de melhores prognósticos e terapêuticas no tratamento da DPE, e, com isso, na sobrevida pós-transplante (CHAMBERS et al., 2017; KRAMER; BAHT; DOIG, 2017; MEERS et al., 2010; PERIS et al., 2019).

Assim sendo, diversas estratégias preventivas têm sido avaliadas, objetivando a redução do dano oxidativo, inflamatório e vascular causados pela LIR, e, conseqüentemente, a diminuição na incidência da DPE (MORRISON; PITHER; FISHER, 2017; PORTEOUS; LEE, 2017).

No arsenal das terapias farmacológicas estudadas estão inclusos agentes antioxidantes, antiplaquetários, inibidores de citocinas, estabilizadores endoteliais, mediadores anti-inflamatórios, inibidores de vias apoptóticas, dentre outros. Apesar dos avanços, a prevenção da DPE por meio destes agentes é limitada, devido ao perfil multifatorial desta disfunção. Desta forma, a utilização preventiva de fármacos com maior espectro de atuação, atuando em diversas vias desencadeadoras da DPE, têm sido sugerida (ABREU et al., 2014; ADATIA et al., 1994; AIGNER et al., 2018; ALMEIDA et al., 2016; INCI et al., 2007; PORTEOUS; LEE, 2017; SCHOSSLEITNER et al., 2015; STONE et al., 2015).

Nesta perspectiva, tendo em vista a participação dos diferentes componentes do SRA no processo patogênico da injúria pulmonar, o presente projeto propôs estudar a hipótese de que a ativação da ECA2 durante o manejo da morte encefálica e ao longo da preservação hipotérmica estática do enxerto previne o estabelecimento da lesão pulmonar aguda associada ao transplante pulmonar.

OBJETIVOS

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da ativação da ECA2 na prevenção da lesão pulmonar aguda (LPA) em modelo experimental de transplante pulmonar unilateral.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade e a concentração dos componentes do sistema renina angiotensina (SRA) no modelo experimental de transplante pulmonar unilateral em ratos;
- Estudar os efeitos da ativação da ECA2 sobre as propriedades mecânicas e resistivas do sistema respiratório, trocas gasosas e alterações morfológicas pulmonares associadas a LPA;
- Analisar o possível efeito anti-inflamatório da ECA2 na LPA induzida no modelo experimental de transplante pulmonar unilateral em ratos;
- Avaliar a ECA2 como moduladora do desequilíbrio redox em pulmões de ratos submetidos ao transplante pulmonar unilateral em ratos;

MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

Pesquisa experimental, longitudinal e descritiva, realizada no período vigente do doutorado em Cirurgia Torácica e Cardiovascular, no Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica (LIM61) e na University Health Network (Latner Thoracic Research Laboratories).

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados para os experimentos ratos Lewis (*Rattus norvegicus*) machos, pesando entre 300 – 400 gramas, provenientes do biotério da Universidade de Campinas (UNICAMP) e do Toronto General Research Institute (UHN). Os animais foram mantidos sob condições de controle de temperatura (22–24°C) e ciclo claro-escuro (12/12 horas), com água e ração *ad libitum*.

Os aspectos éticos do trabalho foram contemplados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA/USP (número de registro: 1532/2020) e pelo Animal Care Committee – AUP/UHN (número de registro: #6858.0).

5.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Foi avaliado o papel da ativação da ECA2 na prevenção da lesão pulmonar aguda (LPA) associada ao evento de morte encefálica ou pneumonite aspirativa, seguidas por transplante pulmonar unilateral à esquerda nos animais receptores.

5.2.1 Estudo I – Modelo de morte encefálica + transplante pulmonar

Com o objetivo de avaliar os potenciais benefícios fisiológicos da ativação da ECA2 durante o manejo dos doadores de morte encefálica, foram conduzidos experimentos de captação e transplante pulmonar em roedores (*Figura 9*). Para tanto, os animais foram distribuídos aleatoriamente através de sorteio nos seguintes grupos experimentais:

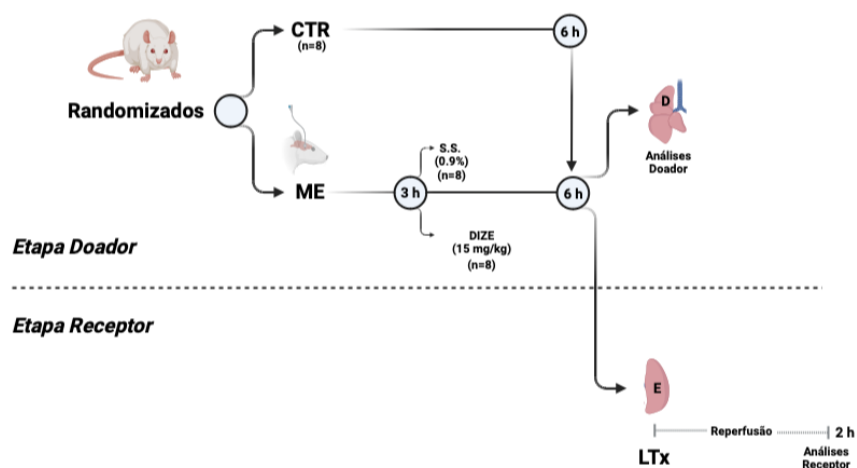
1) Controle (grupo CTR): Grupo de animais que foram submetidos à ventilação mecânica controle previamente ao transplante. Após este período, foi realizada a extração do bloco cardiopulmonar e realização do transplante unilateral à esquerda, seguido de reperfusão por 2 horas (n=8).

2) Morte encefálica (grupo ME): Grupo de animais que foram submetidos ao processo de morte encefálica, tratados com solução salina

à 0.9% (2 mL; via i.p; 3 horas após a indução da morte encefálica) e mantidos em ventilação mecânica por 6 horas. Após este período, foi realizada a extração do bloco cardiopulmonar e a realização do transplante unilateral à esquerda, seguido de reperfusão por 2 horas (n=8).

3) Aceturato de diminazeno (grupo DIZE): Grupo de animais que foram submetidos ao processo de morte encefálica, tratados com DIZE (15 mg/kg⁻¹; Cat. D770, Sigma-Aldrich; via i.p; 3 horas após a indução da morte encefálica) e mantidos em ventilação mecânica por 6 horas. Após este período, foi realizada a extração do bloco cardiopulmonar e a realização do transplante unilateral à esquerda, seguido de reperfusão por 2 horas (n=8).

Figura 9 - Desenho experimental do estudo I.



Fonte: Elaborado com BioRender.com.; CTR, controle; ME, morte encefálica; S.S., solução salina; DIZE, aceturato de diminazeno; D, pulmão direito; E, pulmão esquerdo; LTx, transplante pulmonar.

5.2.1 Estudo II – Modelo de pneumonite aspirativa + transplante pulmonar

Para avaliar o efeito da ativação da ECA2 no condicionamento da LPA associada à aspiração de ácido, foram realizados experimentos de captação e transplante pulmonar em roedores (*Figura 10*). Após a exposição do bloco

cardiopulmonar, os pulmões previamente lesionados por ácido foram randomizados nos seguintes grupos experimentais:

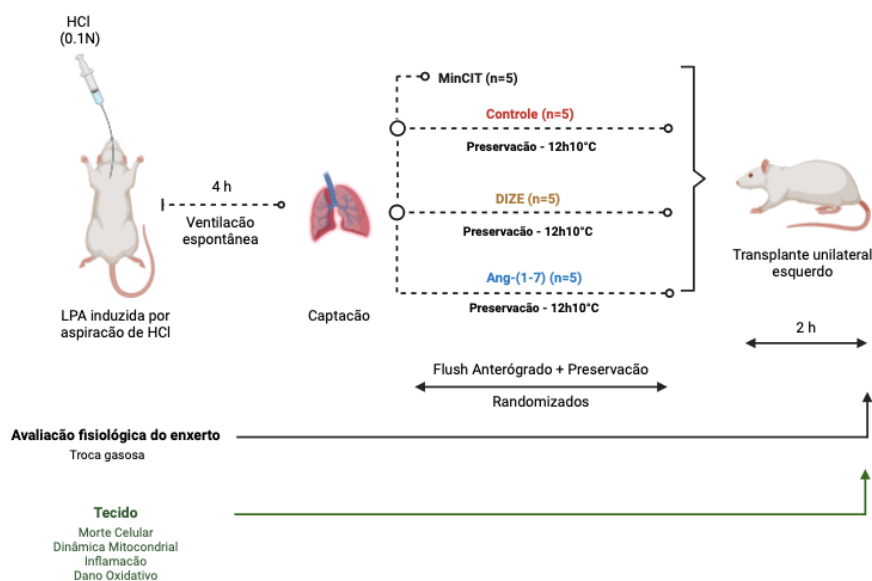
1) *Transplante imediato (grupo MinCIT):* Pulmões previamente lesionados por modelo de aspiração, que receberam lavagem anterógrada com solução de preservação, e que foram mantidos em gelo ($0 - 4^{\circ}\text{C}$) pelo tempo necessário (70 ± 18 min) para preparo cirúrgico imediato do animal receptor e implante do pulmão ($n=5$).

2) *Solução de preservação (grupo Controle):* Pulmões previamente lesionados por modelo de aspiração, que receberam lavagem anterógrada com solução de preservação, e que foram mantidos em preservação hipotérmica estática por 12 horas à 10°C em “cooler” termoelétrico. Após o período de preservação, foi realizado o transplante unilateral à esquerda, seguido de reperfusão por 2 horas ($n=5$).

3) *Solução de preservação + aceturato de diminazeno (grupo DIZE):* Pulmões previamente lesionados por modelo de aspiração, que receberam lavagem anterógrada com solução de preservação enriquecida com o ativador da ECA2 (DIZE; Cat. D770, Sigma-Aldrich; 0.1 mM), e que foram mantidos em preservação hipotérmica estática por 12 horas à 10°C em “cooler” termoelétrico. Após o período de preservação, foi realizado o transplante unilateral à esquerda, seguido de reperfusão por 2 horas ($n=5$).

4) *Solução de preservação + angiotensina-(1-7) [grupo Ang-(1-7)]:* Com o objetivo de avaliar os efeitos da administração do produto final do eixo protetor do SRA, foi incluído um grupo de pulmões previamente lesionados por modelo de aspiração, que receberam lavagem anterógrada com solução de preservação enriquecida com angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7); 0.22 nM; Cat#4006081, Bachem], e que foram mantidos em preservação hipotérmica estática por 12 horas à 10°C em “cooler” termoelétrico. Após o período de preservação, foi realizado o transplante unilateral à esquerda, seguido de reperfusão por 2 horas ($n=5$).

Figura 10 - Desenho experimental do estudo II.



Fonte: Elaborado com BioRender.com.; HCl, solução de ácido clorídrico; LPA, lesão pulmonar aguda; MinCIT, transplante imediato com curto período de isquemia fria; DIZE, aceturato de diminazeno; Ang-(1-7), angiotensina-(1-7).

5.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais foram anestesiados em câmara fechada com isoflurano a 5% e submetidos à intubação orotraqueal e ventilação mecânica através de ventilador para roedores (Harvard Apparatus, modelo 683). O suporte anestésico foi mantido com isoflurano a 2-3%.

Com os animais posicionados em decúbito dorsal em placas aquecedoras, a artéria e a veia femoral direita foram canuladas, utilizando cateter confeccionados com perfusor infantil e dispositivo periférico intravenoso (24-gauge) preenchidos com solução salina heparinizada (500 IU/mL) e inseridos delicadamente com auxílio de microscópio estereoscópico (Zeiss, modelo Stemi 508). O catéter da artéria femoral direita foi conectado a um monitor (Dixtal, DX2021, Brasil) para registro da pressão arterial média (PAM). A veia femoral foi utilizada para infusão de líquidos durante todo o procedimento.

5.3.1 Modelo experimental de morte encefálica

Após intubação orotraqueal, os animais foram posicionados em decúbito ventral para a realização da trepanação craniana (executada através de uma

broca motorizada) e inserção de um cateter Fogarty-4F (Edwards Lifescience LLC, Irvine, CA, USA), conforme previamente descrito (NEPOMUCENO et al., 2024). A efetiva indução da morte encefálica foi realizada através da rápida insuflação do cateter com 500µL de solução salina (0,9%). A morte encefálica foi confirmada pela observação do pico hipertensivo, ausência de reflexos, midríase bilateral e apneia. Após a indução da morte encefálica a anestesia foi suspensa e o animal foi mantido em ventilação mecânica (FiO₂ de 21%, pressão positiva expiratória final - PEEP de 3 cmH₂O, 10 mL/kg e 60 ciclos/min) por 6 horas. Após este período o pulmão esquerdo foi preparado para o transplante, seguido de 2 horas de reperfusão.

5.3.2 Modelo experimental de pneumonite aspirativa

Após intubação orotraqueal, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para a realização da instilação do ácido, conforme previamente descrito (SETZER et al., 2018). A instilação foi realizada através da administração gradual de solução de HCl (4 mL – 0.1N), seguida por ventilação mecânica em decúbito dorsal por 3 minutos (FiO₂ de 50%, pressão positiva expiratória final - PEEP de 2 cmH₂O, 10 mL/kg e 60 ciclos/min) objetivando melhor distribuição da solução instilada. Em seguida, os animais foram decanulados e mantidos em ventilação espontânea por 4 horas. Após este período o pulmão esquerdo foi preparado para o transplante, seguido por 2 horas de reperfusão.

5.3.3 Extração do bloco cardiopulmonar

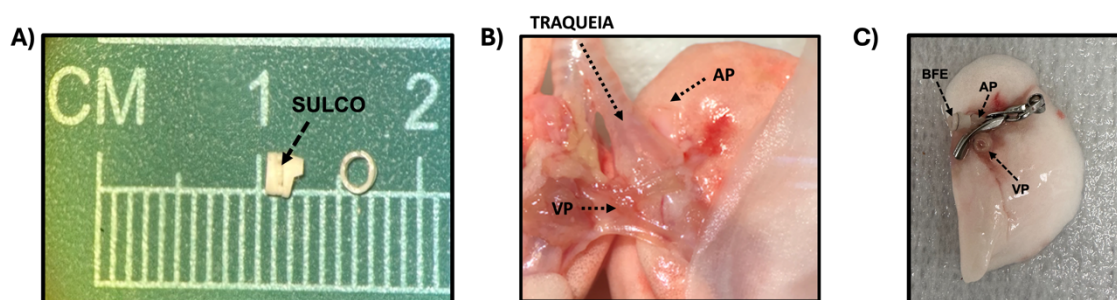
Ainda em posição dorsal, foi infundida heparina (400-500 USP) na veia cava abdominal. Subsequentemente, foi realizada uma toracotomia com ressecção do esterno e abertura radial do diafragma. Através da timectomia o coração foi exposto, procedendo com ventriculotomia direita adjacente à artéria pulmonar, secção da veia cava inferior, e ventrículo esquerdo longitudinalmente na ponta. A lavagem pulmonar anterógrada foi realizada com 30 mL de solução de preservação (Perfadex®, Vitrolife Göteborg, Suécia), através de uma cânula introduzida na artéria pulmonar. Já no *Estudo II* os pulmões foram lavados com

20 mL de solução de preservação contendo 10 µg/mL de prostaglandina E1 suplementada ou não com DIZE e Ang-(1-7) à temperatura ambiente.

A solução de preservação foi administrada por gravidade a partir de um reservatório posicionado 20 cm acima do coração, com drenagem espontânea do efluente pela ventriculotomia esquerda. Ao término da lavagem, a traqueia foi ligada com um fio abaixo da cânula, e a extração pulmonar foi realizada. O bloco cardiopulmonar foi removido em capacidade pulmonar total.

Finalmente, o pulmão esquerdo foi preparado sobre gelo para o implante por meio de adaptação da técnica dos “cuffs”. Para isso foram posicionados *cuffs* (16-gauge) na artéria e veia pulmonar e uma cânula rígida (14-gauge) na traqueia do animal doador, confeccionados a partir de cateteres intravenosos (DE PERROT et al., 2005; MIZUTA et al., 1989). Para o *Estudo II*, o *cuff* foi posicionado no brônquio fonte esquerdo (14-gauge) (*Figura 11*).

Figura 11 - Técnica dos *cuffs* utilizada para implante do enxerto.



A) *Cuffs* confeccionados a partir de cateteres intravenosos. Os sulcos foram feitos para fixação dos fios 7-0. B) Isolamento das estruturas do hilo pulmonar para inserção dos *cuffs*. C) *Cuffs* posicionados nas estruturas do doador (*Estudo II*). VP, veia pulmonar; AP, artéria pulmonar; BFE, brônquio fonte esquerdo. Fonte: Elaborado pelo autor.

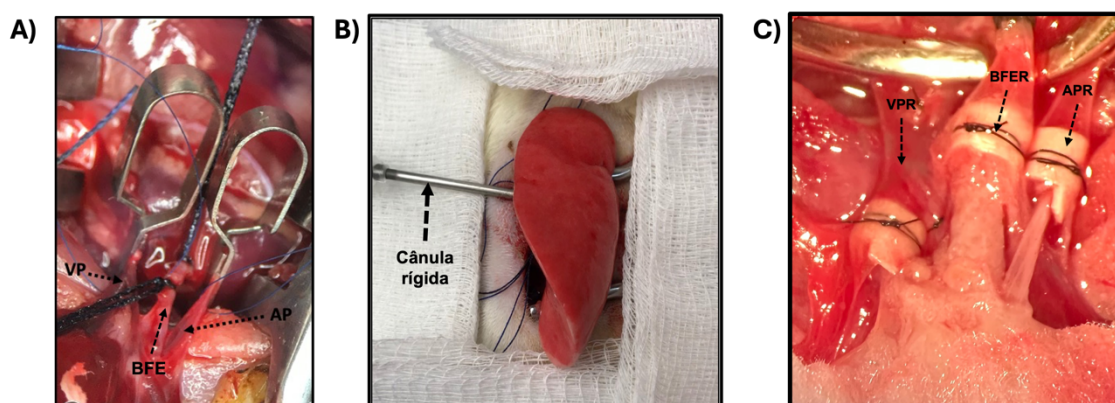
5.3.4 Modelo experimental de transplante pulmonar

No *Estudo I* os animais receptores foram anestesiados da mesma forma que os doadores (*ver item 5.3*), enquanto no *Estudo II* os animais receptores foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de cetamina (60 mg/Kg) e xilazina (6 mg/Kg). Em seguida, os animais receberam intubação orotraqueal e foram mantidos em decúbito lateral direito para subsequente toracotomia

esquerda por meio de incisão no 5º espaço intercostal. Após a dissecação e clampeamento das estruturas hilares com o auxílio de microscópio (Zeiss, modelo Stemi 508), o enxerto foi posicionado sobre o pulmão nativo e o implante iniciado com uma secção parcial da parede da artéria pulmonar esquerda, progredindo-se o *cuffs* 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 a veia, além do brônquio esquerdo no caso do *Estudo II* (MIZUTA et al., 1989). A traqueia do pulmão transplantado no *Estudo I* foi conectada a um segundo ventilador (Harvard Apparatus, modelo 683) com os seguintes parâmetros: FiO₂ de 100%, 4 mL/kg e 80 ciclos/min (DE PERROT et al., 2005) (*Figura 12*).

A seguir, o *clamp* da veia pulmonar foi aberto e em seguida o *clamp* da artéria retirado, seguido à perfusão gradual do enxerto.

Figura 12 - Técnicas para o implante dos enxertos.



A) Isolamento das estruturas hilares do animal receptor para inserção do enxerto pulmonar. B) Transplante pulmonar unilateral esquerdo com ventilação independente do enxerto (*Estudo I*). C) Transplante pulmonar unilateral esquerdo com *cuff* do brônquio esquerdo implantado nas estruturas hilares nativas do receptor (*Estudo II*). VPR, veia pulmonar receptor; APR, artéria pulmonar receptor; BFER, brônquio fonte esquerdo receptor. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.4.1 Reperusão no animal receptor

O período de reperusão começou a ser contado após a abertura da artéria pulmonar e começo da perfusão do pulmão recém implantado. A

reperfusão durou 2 horas, tempo necessário para observação dos primeiros marcadores associados a DPE (SNELL et al., 2017). O animal ficou sob indução anestésica durante todo o protocolo. Após este período foi coletado o sangue da veia pulmonar para as análises de função do enxerto e o lado esquerdo do pulmão foi removido para estudo.

5.4 ANÁLISES DE FUNÇÃO PULMONAR

5.4.1 Efetividade da troca gasosa

Amostras de sangue arterial dos animais doadores foram coletadas por meio do acesso à artéria femoral (*ver item 5.3*). Para o *Estudo I*, as amostras foram coletadas imediatamente ao final do processo de morte encefálica. No *Estudo II* as amostras foram coletadas 4 horas após a administração intratraqueal da solução de HCl.

Nos animais receptores, as amostras foram coletadas (agulha, 27-gauge) diretamente da veia pulmonar esquerda após 2 horas de reperfusão, a partir dos pulmões transplantados. Em seguida, amostras de tecido foram coletadas, congeladas em nitrogênio e armazenadas à -80°C ou fixadas para análise histológica.

5.4.2 Análise da mecânica pulmonar

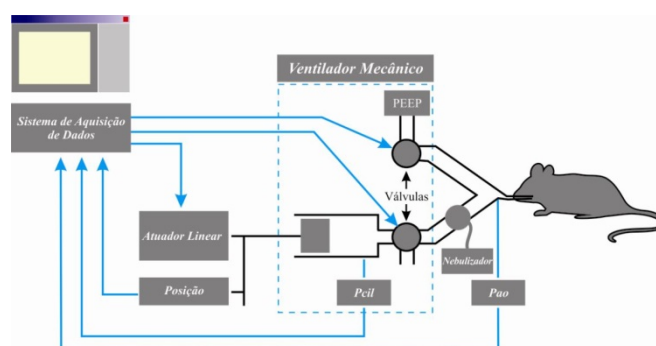
A mecânica ventilatória dos animais foi avaliada somente durante o *Estudo I*. Para tanto, os parâmetros dos doadores foram mensurados imediatamente ao final do processo de morte encefálica. Para os receptores, a ventilação do enxerto pulmonar isolado (caixa torácica aberta) foi mantida a uma frequência de 80 ciclos/min, um volume corrente de 4 mL/kg, com limitação de pressão a 30 cmH₂O, e uma PEEP de 3 cmH₂O (Adaptado de DE PERROT et al., 2005), sendo avaliados imediatamente após o implante (basal) e ao final do protocolo do transplante pulmonar.

As análises foram realizadas pelo ventilador *FlexiVent* (flexiVent®, SCIREQ, Montreal, Canadá). Este ventilador foi controlado por um computador,

capaz de intercalar a ventilação mecânica com uma variedade de manobras (perturbações) com pressão e volume controlados para obter medidas precisas e reproduzíveis de mecânica respiratória (*Figura 13*). Os animais doadores foram ventilados a uma frequência de 60 ciclos/min, um volume corrente de 10 mL/kg, com limitação de pressão a 30 cmH₂O, e uma PEEP de 3 cmH₂O.

Os dados foram coletados através de um software específico flexiWare7, permitindo a análise, a visualização de gráficos da ventilação e o arquivamento dos dados.

Figura 13 - Esquema mostrando animal vs. ventilador vs. software.

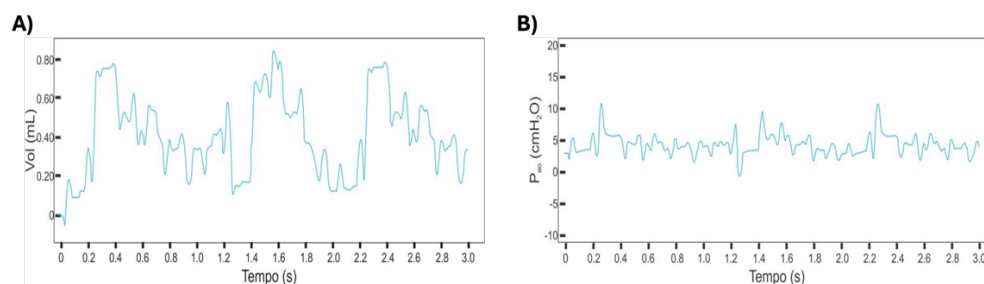


Fonte: SCIREQ, Montreal, Canadá.; PEEP, pressão positiva ao final da expiração; P_{cil}, pressão no cilindro; P_{ao}, pressão de abertura das vias aéreas.

5.4.2.1 Medida dos parâmetros do modelo de fase constante

Para a obtenção da impedância do sistema respiratório foi aplicada uma perturbação (*quick-prime*) que consiste na imposição de um fluxo de ar com amplitude correspondente à soma de senoides de frequências entre 1,00 a 20,5 Hz, conforme ilustrado na *figura 14*. A partir dessas perturbações foram obtidos os valores de resistência newtoniana (R_N), resistência tecidual (G), elastância tecidual (H) e histeresividade (η).

Figura 14 - Traçados ilustrativos das perturbações “quick-prime”.

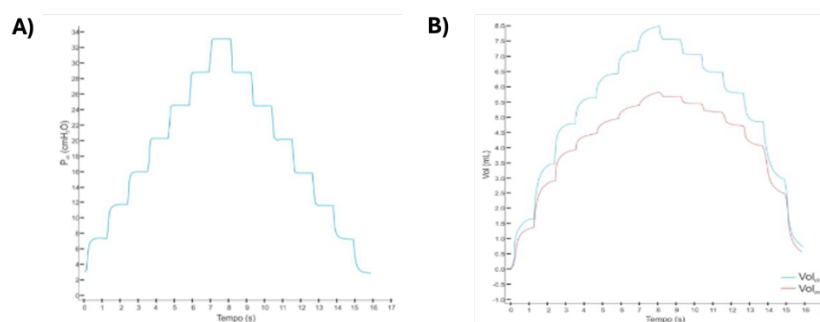


Fonte: SCIREQ, Montreal, Canadá.; A) Gráfico: volume x tempo durante a manobra *quick-prime*; B) Gráfico: pressão na via aérea x tempo durante a manobra *quick-prime*.; Vol, volume; P_{ao} , pressão de abertura das vias aéreas.

5.4.2.2 Curva Pressão-Volume

Para obtenção dos pontos da curva de pressão-volume, a pressão na traqueia foi elevada até 30 cmH₂O em intervalos igualmente espaçados de pressão pré-estabelecidos, com registros dos valores de volume de platô correspondentes a essas pressões (*Figura 15*). O mesmo procedimento, com decrementos na pressão, foi realizado para a obtenção do ramo expiratório da curva.

Figura 15 - Traçados ilustrativos das curvas pressão-volume.



Fonte: SCIREQ, Montreal, Canadá.; A) Pressão no cilindro x tempo na construção da curva PV. B) Volume x tempo na construção da curva PV.; Volcil: volume no cilindro. Volao: volume na via aérea.

5.4.2.3 Protocolo experimental

Após a conexão do animal ao ventilador conforme descrito previamente, foram transcorridos cinco minutos para acomodação do animal, verificação de possíveis vazamentos, obstruções e correções do posicionamento em relação ao ventilador.

Na primeira etapa do protocolo, após o período de estabilização, foram realizadas 3 perturbações “*deep inflation*”, utilizadas para determinação da capacidade inspiratória (CI). Após estas manobras ventilatórias, foram realizadas 3 perturbações “*quick-prime*”, utilizadas para determinação dos parâmetros do modelo de fase constante (R_N , G , H).

Na segunda etapa do experimento, foram realizadas uma sequência de 3 curvas Pressão vs. Volume (Curva PV), que proporcionou as medidas da complacência estática (C_{st}), capacidade inspiratória (CI) e a área sob a curva. O parâmetro para o critério de exclusão dos dados foi COD < 0.9.

5.5 ANÁLISE DA RAZÃO PESO ÚMIDO/SECO

Para análise da relação peso úmido/seco, o lobo caudal do pulmão direito, originário do animal doador, e sua porção correspondente (após secção) do pulmão esquerdo, utilizado como enxerto no animal receptor, foram utilizados. Já para o *Estudo II*, o terço superior do enxerto pulmonar foi coletado após reperfusão pulmonar. O peso úmido (mg) foi avaliado primeiro. Em seguida o tecido foi armazenado em estufa (3 dias/80°C) antes de ter seu peso seco (mg) mensurado. A razão U/S foi calculada como peso úmido/peso seco.

5.6 DOSAGEM DE CITOCINAS NO TECIDO PULMONAR

Depois de homogeneizado, o tecido pulmonar foi utilizado para quantificação dos níveis de citocinas inflamatórias. Para tanto, foram realizados testes de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Os ensaios seguiram as instruções do fabricante. *Estudo I*: TNF- α (Cat. RAB0480; Sigma-Aldrich), IL-1 β (Cat. RAB0278; Sigma-Aldrich), IL-6 (Cat. RAB0312; Sigma-Aldrich) e IL-10 (Cat. RAB0246; Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). *Estudo II*: TNF- α

(Cat#RTA00-1; R&D Systems), IL-1 β (Cat#RLB00-1; R&D Systems) e IL-8 (Cat. Cat#MBS9141543; MyBioSource).

5.7 MARCADORES REDOX NO TECIDO PULMONAR

Depois de homogeneizado em tampão PBS (do inglês, *Phosphate-buffered Saline*), o tecido pulmonar foi utilizado para os ensaios bioquímicos. Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram avaliados pelo ensaio do sal azul de nitrotetrazólio (Cat. No. N6876, Sigma-Aldrich) em um comprimento de onda de 630 nm (SIM CHOI et al., 2006). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida monitorando a inibição da auto-oxidação da adrenalina (Cat. No. E4642, Sigma-Aldrich) em um comprimento de onda de 480 nm (BANNISTER; BANNISTER; ROTILIO, 1987). A atividade da catalase (CAT) foi medida pela taxa de diminuição das concentrações de peróxido de hidrogênio (Cat. No. 102329854, Sigma-Aldrich) monitoradas a 240 nm (AEBI, 1984). Como índice de dano oxidativo induzido pela peroxidação lipídica, utilizamos o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Cat. No. T5500, Sigma-Aldrich) para analisar produtos de malondialdeído (MDA) durante uma reação de aquecimento ácido monitorada a 532 nm, conforme descrito anteriormente (DRAPER; HADLEY, 1990); MDA, *Estudo II* (Kit de ELISA; Cat#KTE100650, Abbkine).

5.8 COMPONENTES DO SRA E ATIVIDADE DA ECA2 NO TECIDO PULMONAR

A quantificação de Ang II (Cat. ELK1400; ELK Biotechnology) e Ang-(1-7) (Cat. ELK7677; ELK Biotechnology) durante o *Estudo I*, foi realizada pelo método de ELISA. Os ensaios seguiram as instruções do fabricante. A atividade da ECA2 foi detectada por espectrofotometria. O tecido pulmonar foi previamente diluído em meio contendo tampão ECA/ECA2 e a taxa de ativação enzimática foi monitorada conforme as instruções do fabricante (Cat. MAK377, Sigma-Aldrich).

5.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PULMONAR

Para avaliação histopatológica pulmonar, amostras de tecido pulmonar foram lavadas com solução fisiológica à 4°C e fixados em formaldeído 10% por 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram colocados em caixetas perfuradas e mantidas em etanol 70% até a inclusão em blocos de parafina.

O processo de parafinização foi realizado pelo processador automático de tecido Histoquine (Jung-Histokinette2000 Leica, Nussloch, Alemanha), com duração aproximada de 14 horas. O processo foi iniciado pela desidratação dos tecidos em concentrações progressivas de álcool (álcool 50%, álcool 70%, álcool 96% (2 banhos)), álcool absoluto (2 banhos), seguido para diafanização, e passagem dos tecidos em uma solução de álcool absoluto + xilol e xilol (3 banhos), sendo então imersos em parafina fundida a 60°C. O material parafinado foi incluído em blocos e permaneceu em temperatura ambiente.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) com navalhas descartáveis. As secções, com espessura entre 3 e 4 µm, foram aderidas em lâminas previamente revestidas por Silano 2% (Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA). As lâminas com os cortes permaneceram em estufa (Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil) à 60°C por 2 horas e em seguida foram armazenadas em temperatura ambiente.

Para a coloração por hematoxilina e eosina (H&E), após desparafinização, as lâminas foram deixadas, aproximadamente, uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, foram imersas em hematoxilina (previamente filtrada) durante 10 minutos e, posteriormente, lavadas em água corrente. Após 10 minutos de lavagem, as lâminas foram imersas em eosina, por 3 minutos. Após esse período foram fixadas com ácido acético, desidratadas e montadas com lamínulas com meio permanente *Permount* (Fisher Chemical, Pittsburgh, EUA).

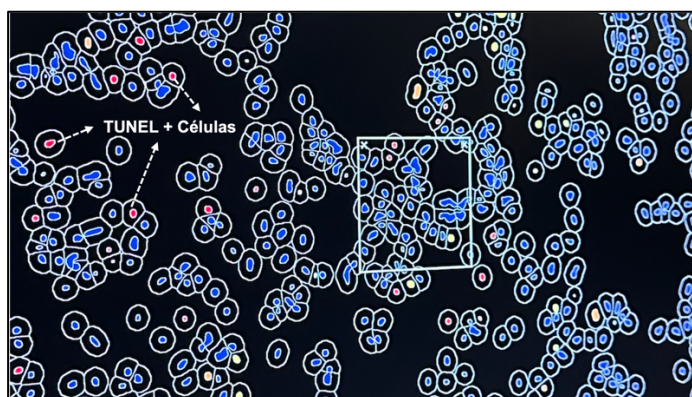
Os cortes histológicos foram avaliados para presença de LPA. O grau de lesão pulmonar foi determinado usando um sistema de graduação previamente descrito (ABDELNOUR-BERCHTOLD et al., 2022). Os principais critérios usados para a avaliação do escore de lesão pulmonar foram: infiltração de células brancas sanguíneas, exsudatos de fibrina, hemorragia alveolar e congestão capilar. A severidade de cada parâmetro foi marcada como: 0,

ausente; 1, leve; 2, moderado; 3, severo. A combinação dos escores dos 4 parâmetros foram avaliadas para cada animal.

5.10 AVALIAÇÃO DE MARCADOR PARA MORTE CELULAR

Objetivando avaliar o processo de apoptose celular (*Estudo II*), lâminas histológicas brancas foram coradas com deoxinucleotidil terminal transferase (TUNEL; do inglês, deoxynucleotide transferase-mediated deoxy uridine triphosphate nick-end labeling; Roche Diagnostics Gmb). Cortes histológicos foram contrastados com DAPI e montado com meio de montagem fluorescente (IHC-World, Cat#E19-18). Todas as lâminas coradas com TUNEL foram digitalizadas usando um scanner de lâminas inteiras para Fluorescência (Axio Scan.Z1, Carl Zeiss Microscopy GmbH). As células positivas para TUNEL foram então quantificadas utilizando software de análise de imagem (HALO Image Analysis Software, Pelkin Elmer) e expressas como uma porcentagem do total de células (*Figura 16*).

Figura 16 - Quantificação do processo de apoptose celular no parênquima pulmonar após transplante.



HALO Image Analysis Software destacando células intensamente coradas por método de TUNEL (em vermelho). Fonte: Elaborado pelo autor.

5.11 IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunohistoquímica (IHQ) foi realizada nas secções de parafina (4 µm) de amostras de tecido do *Estudo I*. Brevemente, todos os cortes foram embebidos em parafina, desparafinizados e reidratados. As secções foram incubadas com anticorpo primário anti-Nrf2 (1:100) 4°C durante a noite. A coloração IHQ foi realizada por meio de anticorpo secundário marcado com HRP (Spring) e método do complexo estreptavidina-biotina. O reagente de desenvolvimento de cor DAB (Spring) foi usado como cromógeno. A hematoxilina foi realizada para o contra corante.

O resultado da IHQ foi analisado por meio do software *Image Pro-Plus* 6.0. O aumento de vezes da expressão de Nrf2 em diferentes grupos em comparação a marcação controle foi calculado seguindo a fórmula: Aumento de vezes no Grupo X (%) = Valor de cor no Grupo X/Valor de cor no Controle * 100%.

5.12 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão gênica mitocondrial foi avaliada usando um kit customizado RT2 PCR para ratos (CLAR51094; Qiagen) que inclui genes para biogênese (PPARG, PPARGc1A, PPARGc1B e TFAM), fusão mitocondrial (MFN1, MFN2 e OPA1), fissão mitocondrial (MFF e FIS1) e mitofagia (PARK2 e PINK1).

Seguindo os protocolos do fabricante, o RNA foi convertido em cDNA (Cat#330404, RT2 SYBR Green qPCR Master Mix, Qiagen). Os valores de Ct foram analisados usando o software de análise de dados de PCR Qiagen RT2 Profiler. Os genes foram normalizados usando a média geométrica dos genes “Housekeeping” ACTA1 e ACTG1.

5.13 ANÁLISE DOS DADOS E ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os gráficos foram produzidos e analisados estatisticamente pelo software GraphPad Prism 8. Foram considerados estatisticamente significantes

os resultados que apresentarem probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ($p < 0,05$). Para comparação de dois grupos foi realizado o teste t de Student. Para mais de dois grupos experimentais, foi utilizado o teste ANOVA seguido por análises post-hoc, conforme apropriado.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESTUDO I – A ATIVAÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA 2 (ECA2) REDUZ O PROCESSO INFLAMATÓRIO E O ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE MORTE ENCEFÁLICA SEGUIDO POR TRANSPLANTE PULMONAR EM RATOS.

6.1.1 O estabelecimento do modelo animal de morte encefálica resulta no comprometimento da função pulmonar do doador.

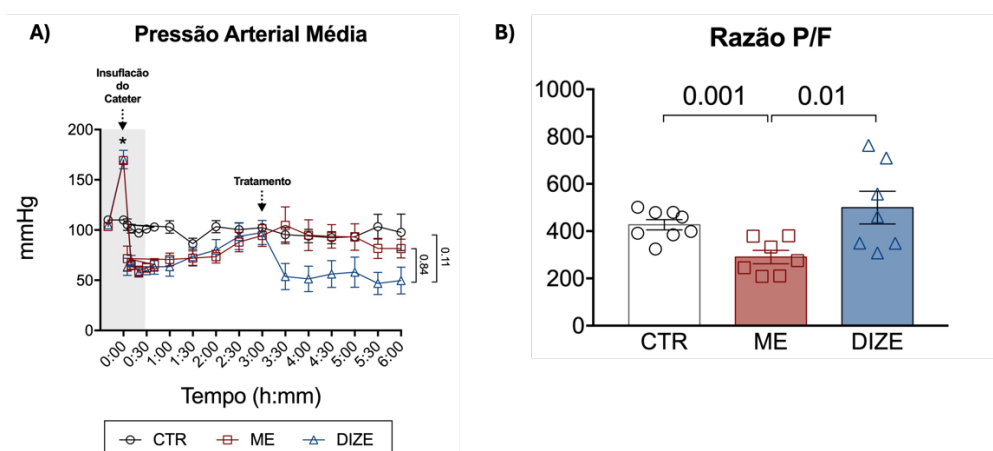
Com o objetivo de avaliar o impacto da ativação da ECA2 no manejo dos doadores de morte encefálica, foi utilizado um modelo animal de indução abrupta. 3 horas após a indução da morte encefálica, os animais foram randomizados para tratamento com ativador da ECA2. Ao final do protocolo, o pulmão esquerdo foi captado e em seguida transplantado. Um terceiro grupo avaliando condições controle foi incluído (*Figura 9*).

O peso dos animais foi similar entre todos os grupos (CTR: 354 ± 1 ; ME: 356 ± 10 vs. DIZE: 354 ± 9 g; $p = 0.97$). Para realização da lesão encefálica, um cateter foi inserido e insuflado no interior da cavidade intracraniana, promovendo um aumento abrupto da PIC, seguido por elevação rápida e transitória da PAM (ME: 169 ± 3.7 ; DIZE: 170 ± 9.1 vs. CTR: 110 ± 0.5 mmHg; $p = 0.0004$; *Figura 17A*). Após o estabelecimento da morte encefálica, os animais doadores foram estabilizados e mantidos em ventilação mecânica por um período de 6 horas, com as avaliações *in vivo* sendo realizadas imediatamente antes da extração do bloco cardiopulmonar. Apesar da elevação inicial da PAM, não foram observadas diferenças significativas nos níveis pressóricos dos diferentes grupos ao long do protocolo de morte encefálica (ME: 74 ± 7 ; DIZE: 68 ± 9 mmHg; vs. CTR: 100 ± 4.5 mmHg; $p = 0.13$).

A razão P/F nos animais controle apresentaram valores de 427 ± 21 mmHg, reduzindo para valores de aproximadamente 290 ± 28 mmHg após o protocolo de morte encefálica. No entanto, o tratamento dos doadores com o ativador da ECA2 promoveu melhora significativa da oxigenação (499 ± 69 mmHg) comparada com o grupo ME ($p = 0.01$; *Figura 17B*). A *Tabela 4* apresenta outras variáveis gasométricas e metabólicas estudadas.

Finalmente, objetivando avaliar as possíveis alterações na população de células brancas sanguíneas após evento de morte encefálica, foi realizada a contagem total de leucócitos. Passadas 6 horas da indução da morte encefálica, houve diminuição do número total de leucócitos tanto para o grupo ME (Basal: $263,1 \pm 14,08$ vs. Final: $132,6 \pm 12,42$ mm³; $p=0.0003$), quanto para o grupo DIZE (Basal: $244,8 \pm 27,96$ vs. Final: $113,8 \pm 13,62$ mm³; $p=0,0006$), porém não apresentando diferença estatística entre eles.

Figura 17 - O estabelecimento do modelo animal de morte encefálica resulta no comprometimento da função pulmonar do doador.



A) Pressão arterial média (PAM) registrada em diferentes momentos (basal até 6 horas) em ratos submetidos à morte encefálica. B) Razão P/F (como um índice de oxigenação). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 7-8$). Os grupos foram testados através da análise de variância (One ou *Two-way* ANOVA) com pós-teste de Sidak ou método de Student-Newman-Keuls, conforme apropriado. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Características gasométricas e metabólicas de ratos controle e submetidos à morte encefálica.

Grupo/Parâmetros	CTR (n=7-8)	ME (n=6-8)	DIZE (n=5-8)	Valor-p
pH	7.51 ± 0.011	7.45 ± 0.03	7.44 ± 0.02	0.11
PaO ₂ , mmHg	92.29 ± 3.73	64.97 ± 7.61	104.9 ± 14.5	0.01 ^a
PaCO ₂ , mmHg	28.07 ± 1.29	25.03 ± 2.93	22.62 ± 2.6	0.26
SatO ₂ , %	97.5 ± 0.48	90 ± 3.76	97.2 ± 0.9	0.03 ^b
Hct, %	34.43 ± 1.63	29.86 ± 1.48	30.2 ± 1.1	0.07
Lactato, mg/dL	1.48 ± 0.1	1.71 ± 0.28	2.3 ± 0.3	0.004 ^c
HCO ₃ ⁻ , mg/dL	23.09 ± 0.7	17.2 ± 0.60	17.43 ± 1	<0.0001 ^d

Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (*One-way ANOVA*) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. ^a significa a diferença entre o grupo DIZE e o ME. ^b significa a diferença do grupo ME quando comparado ao grupo CTR e DIZE. ^c significa a diferença entre o grupo DIZE e o grupo CTR. ^d significa a diferença entre o grupo CTR quando comparado ao grupo ME e DIZE. *pH*, potencial hidrogeniônico; *PaO₂*, pressão arterial de oxigênio; *PaCO₂*, pressão arterial de dióxido de carbono; *SatO₂*, saturação de oxigênio; *Hct*, hematócrito; *HCO₃⁻*, bicarbonato. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.2 A ativação da ECA2 durante o manejo dos doadores de morte encefálica melhora a qualidade do enxerto.

A morte encefálica é associada com alterações deletérias do parênquima pulmonar que levam ao comprometimento da função e mecânica pulmonar. Logo, foram avaliados diferentes parâmetros de ventilação mecânica ao final das 6 horas de protocolo. Quando comparado com os demais grupos, a ativação da ECA2 durante o manejo da morte encefálica promoveu um aumento da complacência do sistema respiratório (CTR: 0.64 ± 0.01 ; ME: 0.61 ± 0.01 ; DIZE: 0.76 ± 0.05 mL/cmH₂O; $p = 0.02$), acompanhado por redução da resistência tecidual (CTR: 0.40 ± 0.02 ; ME: 0.41 ± 0.01 ; DIZE: 0.25 ± 0.03 cmH₂O/s/mL; $p = 0.01$) (*Tabela 5*).

Em seguida, para confirmar a efetividade da intervenção proposta nesse trabalho, avaliou-se a atividade da ECA2 no tecido pulmonar. Como esperado, a administração do DIZE, aumentou significativamente a atividade da ECA2 comparado com o grupo CTR e ME (CTR: 0.1 ± 0.01 , ME: 0.07 ± 0.01 , DIZE: 0.6 ± 0.14 pmol/min/mg; $p = 0.0003$; *Figura 18A*). Além disso, a análise da razão peso úmido/seco revelou que os pulmões com alta atividade de ECA2 também apresentavam um menor índice de edema pulmonar comparados com o grupo ME (DIZE: 1.7 ± 0.05 vs ME: 2 ± 0.07 ; $p = 0.05$; *Figura 18B*).

Análises histológicas do tecido pulmonar revelaram que os pulmões submetidos as condições da morte encefálica apresentavam maiores sinais de injúria pulmonar comparado com o grupo CTR (CTR: 2.2 ± 0.1 ; ME: 3.2 ± 0.3 ; DIZE: 3 ± 0.2 ; $p = 0.008$; *Figura 18C,E*). Apesar de não reduzir o escore de lesão pulmonar, e corroborando com os achados da razão peso úmido/seco, a

ativação da ECA2 foi capaz de reduzir o edema perivascular do tecido pulmonar (CTR: 11.4 ± 0.7 ; ME: 15.7 ± 1 ; DIZE: $10.7 \pm 1.3 \mu\text{m}^2$; $p=0.006$; *Figura 18D*).

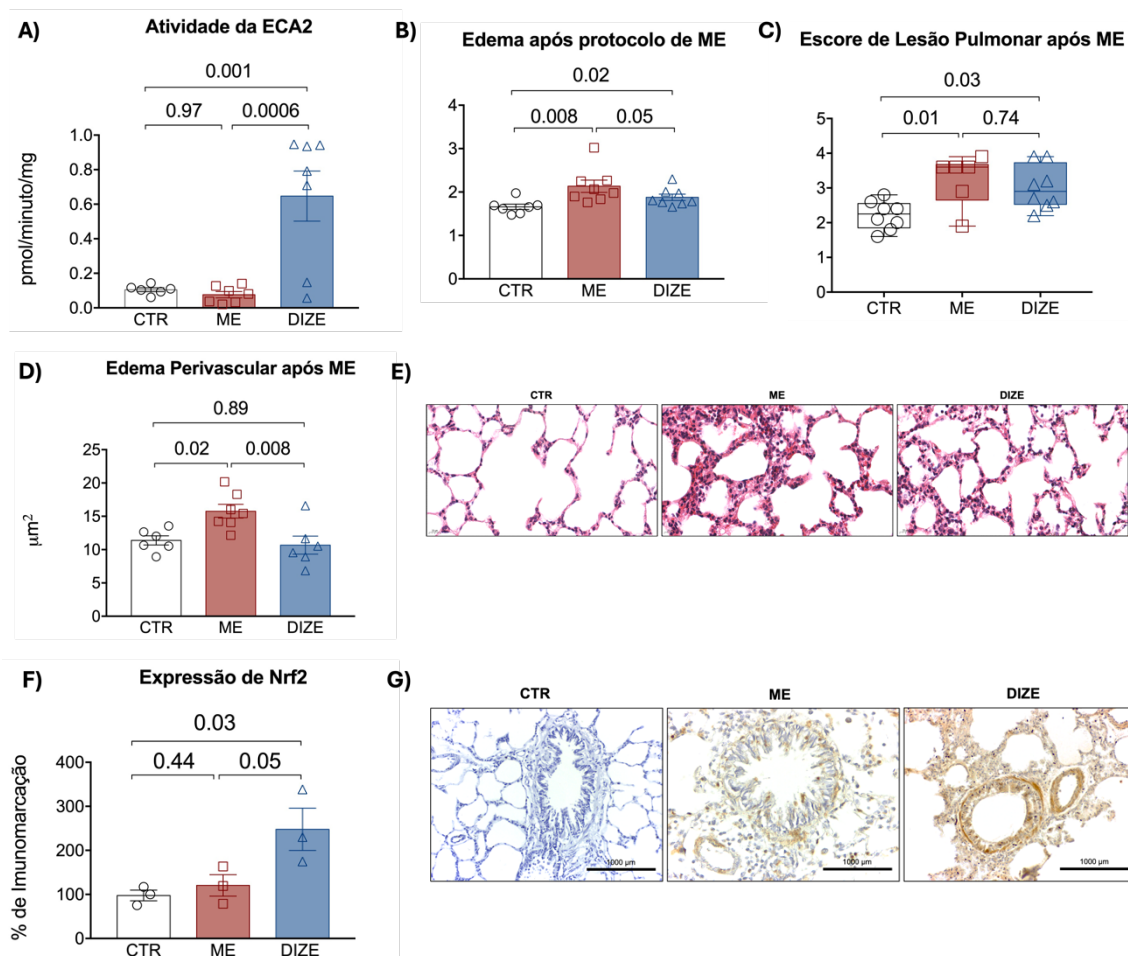
Por fim, a expressão de Nrf2 foi avaliada, tendo em vista seu papel fundamental na regulação das enzimas antioxidantes, e, conseqüentemente, na proteção contra as EROs. Nesse sentido, as análises do tecido pulmonar mostraram uma maior expressão de Nrf2 no grupo DIZE quando comparado aos outros grupos (CTR: 97 ± 12 ; ME: 120 ± 24 ; DIZE: 248 ± 48 % de imunomarcação; $p = 0.03$; *Figura 18F,G*).

Tabela 5 - Valores de mecânica pulmonar em ratos controle e submetidos à morte encefálica.

Grupo/Parâmetros	CTR (n=9)	ME (n=5)	DIZE (n=4)	Valor-p
<i>Cl</i> , mL	13.04 ± 0.42	13.13 ± 0.84	14.34 ± 1.29	0.46
<i>Rrs</i> , cmH ₂ O.s/mL	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.67
<i>Ers</i> , cmH ₂ O/mL	1.56 ± 0.03	1.62 ± 0.03	1.40 ± 0.06	0.02 ^a
<i>Crs</i> , mL/cmH ₂ O	0.64 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.71 ± 0.03	0.01 ^a
<i>R_N</i> , cmH ₂ O.s/mL	0.07 ± 0.006	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.41
<i>G</i> , cmH ₂ O/s/mL	0.40 ± 0.02	0.41 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.01 ^a
<i>H</i> , cmH ₂ O/mL	1.64 ± 0.09	1.48 ± 0.02	1.64 ± 0.09	0.52
Histeresividade	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.02 ^a
<i>Cst</i> , mL/cmH ₂ O	1.16 ± 0.03	1.15 ± 0.05	1.24 ± 0.13	0.67

Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (*One-way ANOVA*) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. ^a significa a diferença entre o grupo DIZE em comparação com os grupos CTR e ME. *Cl*, capacidade inspiratória; *Rrs*, resistência do sistema respiratório; *Ers*, elastância do sistema respiratório; *Crs*, complacência do sistema respiratório; *R_N*, resistência newtoniana; *G*, resistência tecidual; *H*, elastância tecidual; *Cst*, complacência estática. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Figura 18 - A ativação da ECA2 durante o manejo dos doadores de morte encefálica melhora a qualidade do enxerto.



A) Atividade da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) no homogeneizado pulmonar de ratos controle e submetidos à morte encefálica. B) Alteração do peso pulmonar após evento de morte encefálica. C) Escore de lesão pulmonar (valores arbitrários). D) Edema perivascular. E) Fotomicrografias de segmentos pulmonares de ratos corados com H&E. CTR: ratos controle apenas submetidos a extração do bloco cardiopulmonar; ME: ratos induzidos à morte encefálica; DIZE: ratos induzidos à morte encefálica e tratados com DIZE. F,G) Expressão fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) a partir de marcação imuno-histoquímica de cortes histológicos de pulmões de ratos controle e submetidos à morte encefálica (objetiva de 40x; escala - 1000 μm). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 3-8$). Para dados com distribuição normal foi aplicado *One-way ANOVA* com pós-teste de Tukey, já para os não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para análise de múltiplas comparações. Foi considerado um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.3 A ativação prévia da ECA2 durante o manejo da morte encefálica não se traduz em melhora da função do enxerto pós-transplante.

Após o período de acompanhamento da morte encefálica, foi realizada a extração do bloco cardiopulmonar, objetivando o preparo do enxerto para o transplante pulmonar. As características basais dos animais receptores e os fatores operatórios foram similares entre os 3 grupos estudados (*Tabela 6*).

Após o implante, os animais receptores foram monitorados por 2 horas, tempo relacionado à reperfusão do enxerto pulmonar. Este é um ponto crítico para a avaliação da LIR (SNELL et al., 2017). Ao final do período de reperfusão, não foram observadas diferenças na razão P/F (CTR: 239 ± 67 ; ME: 163 ± 51 ; DIZE: 206 ± 44 ; $p = 0.82$; *Figura 19A*) acessada a partir da veia pulmonar ou na pressão inspiratória de pico (PIP) entre os grupos (CTR: 27 ± 1 ; ME: 26 ± 2.6 ; DIZE: 28 ± 0.3 cmH₂O; $p = 0.51$; *Figura 19B*). A *Tabela 7* apresenta outras variáveis gasométricas e metabólicas estudadas.

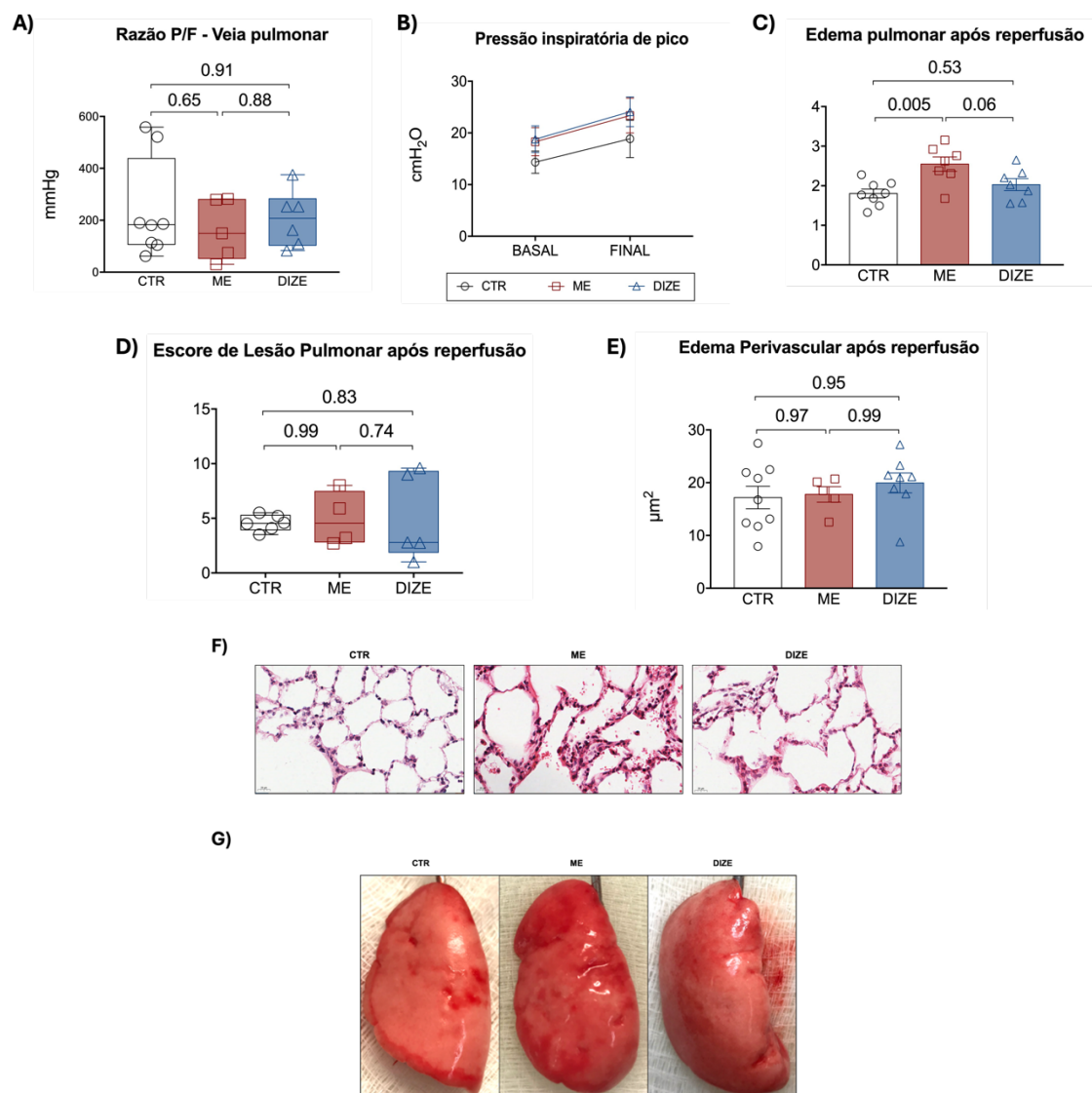
A ativação prévia da ECA2 durante o manejo da morte encefálica tende a prevenir o edema pulmonar após a reperfusão (ME: 2.5 ± 0.1 vs. DIZE: 2 ± 0.1 ; $p = 0.06$; *Figure 19C*). Não foram observadas diferenças significativas no escore de lesão pulmonar ($p = 0.95$) ou nas análises histológicas do edema perivascular ($p = 0.43$) entre os grupos (*Figura 19D-F*). A *Figura 19F* apresenta uma imagem representativa do pulmão após a reperfusão.

Tabela 6 - Fatores operatórios não diferem significativamente entre os grupos.

Grupo/Parâmetro	CTR (n=8)	ME (n=8)	DIZE (n=8)	Valor-p
Peso, g	366 ± 11	365 ± 12	377 ± 9	0.69
Tempo de preparo do bloco, min	26 ± 3	29 ± 3	28 ± 3	0.7
Tempo de isquemia fria*, min	72 ± 5	54 ± 3	62 ± 6	0.13
PAM, mmHg	104 ± 5	93 ± 6.5	92 ± 7	0.38

Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (*One-way ANOVA*) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. PAM, pressão arterial média; *Tempo de isquemia fria = tempo de preparo do bloco pulmonar + tempo de implante do enxerto. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Figura 19 - A ativação prévia da ECA2 durante o manejo da morte encefálica não se traduz em melhora da função do enxerto pós-transplante.



A) Razão P/F acessado a partir da veia pulmonar. B) Pressão inspiratória de pico (PIP) ao longo do período de reperfusão pulmonar. C) Razão entre o peso úmido e seco do pulmão transplantado após 2 horas de reperfusão. D) Escore de lesão pulmonar (valores arbitrários). E) Edema perivascular após reperfusão. F) Fotomicrografias de segmentos pulmonares de ratos corados com H&E. CTR: enxerto pulmonar (pós-reperfusão) originado a partir de ratos controle, submetidos apenas a extração do bloco cardiopulmonar; ME: enxerto pulmonar (pós-reperfusão) originado a partir de ratos induzidos à morte encefálica; DIZE: enxerto pulmonar (pós-reperfusão) originado a partir de ratos induzidos à morte encefálica e tratados com DIZE. G) Visão macroscópica dos enxertos pulmonares após 2 horas de reperfusão. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6-8$). Para dados com distribuição normal foi aplicado *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey ou Sidak (conforme apropriado), já para os não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para análise de múltiplas comparações. Foi considerado um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 - Características gasométricas e metabólicas de ratos submetidos ao transplante pulmonar.

Parâmetros/Grupos	CTR (n=7-8)	ME (n=4-7)	DIZE (n=4-6)	Valor-p
<i>pH</i>	7.15 ± 0.04	7.23 ± 0.07	7.25 ± 0.05	0.48
<i>PaO₂, mmHg</i>	239 ± 67	163 ± 51	206 ± 44	0.82
<i>PaCO₂, mmHg</i>	35.5 ± 4.6	33.3 ± 5.3	39.3 ± 6.5	0.54
<i>SatO₂, %</i>	98 ± 1	99 ± 1	99 ± 0.1	0.42
<i>Hct, %</i>	34.9 ± 2.45	35.3 ± 3.56	36.2 ± 3.06	0.95
<i>HCO₃⁻, mg/dL</i>	23.1 ± 0.69	17.2 ± 0.60	17.43 ± 0.90	<0.0005 ^a

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. a significa a diferença entre o grupo CTR quando comparado ao grupo ME e DIZE. pH, potencial hidrogeniônico; PaO₂, pressão arterial de oxigênio; PaCO₂, pressão arterial de dióxido de carbono; SatO₂, saturação de oxigênio; Hct, hematócrito; HCO₃⁻, bicarbonato. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.4 A ativação da ECA2 reduz a resposta inflamatória associada à lesão por isquemia-reperfusão.

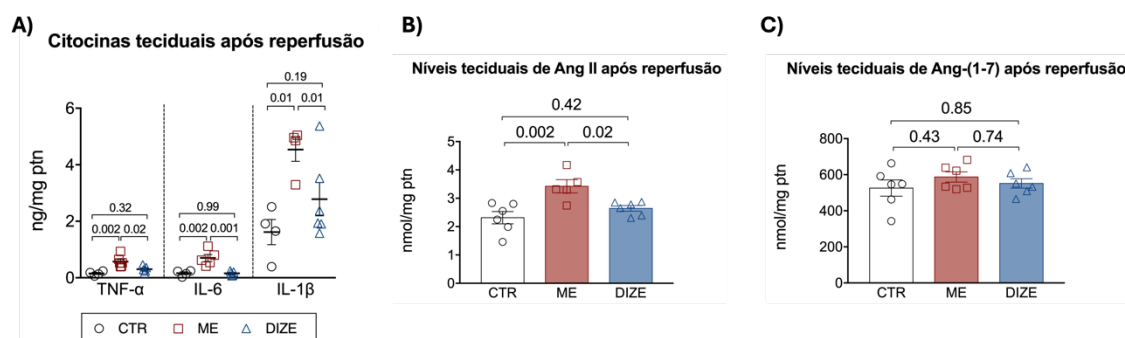
Para avaliar o perfil inflamatório do enxerto após o período de reperfusão, foram avaliados os níveis de diferentes citocinas no tecido pulmonar. Os níveis de TNF- α foram aproximadamente 3,8x maiores no grupo ME (0.6 ± 0.08 ng/mg ptn) quando comparado ao grupo CTR (0.15 ± 0.03 ng/mg ptn; $p = 0.002$). O tratamento prévio com DIZE (0.3 ± 0.05 ng/mg ptn) foi capaz de reduzir em 1,8x os níveis de TNF- α ($p = 0.02$). Os níveis de IL-6 apresentaram um aumento de 4,4x no grupo ME (0.7 ± 0.1 ng/mg ptn) comparado ao CTR (0.2 ± 0.04 ng/mg ptn; $p = 0.002$). A ativação da ECA2 foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de IL-6 após o transplante (DIZE: 0.15 ± 0.03 ng/mg ptn; $p = 0.001$). Os níveis de IL-1 β foram aproximadamente 2,8x maior no grupo ME quando comparado ao grupo CTR (CTR: 1.6 ± 0.4 vs. ME: 4.5 ± 0.4 ng/mg ptn; $p = 0.01$). Assim como nas citocinas analisadas anteriormente, o tratamento com DIZE (2.8 ± 0.6 ng/mg ptn; $p = 0.01$) foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β (Figura 20A).

Não foram observadas diferenças nos níveis de IL-10 nos animais submetidos a ME (0.8 ± 0.2 ng/mg ptn) quando comparado aos CTR (0.9 ± 0.1

ng/mg ptn; $p = 0.9$). O tratamento prévio com o ativador de ECA2 (DIZE: 0.7 ± 0.2 ng/mg ptn; $p = 0.9$) não foi capaz de aumentar os níveis de IL-10.

O período de reperfusão no qual os enxertos pulmonares foram submetidos promoveu um aumento significativo dos níveis teciduais de Ang II no grupo ME (3.4 ± 0.2 nmol/mg ptn), comparado ao grupo CTR (2.3 ± 0.2 nmol/mg ptn). O tratamento prévio com o ativador de ECA2 foi capaz de prevenir o aumento deste peptídeo (2.6 ± 0.1 nmol/mg ptn; $p = 0.003$; *Figura 20B*). Não foram observadas alterações significativas nos níveis de Ang-(1-7) ao final do protocolo de transplante pulmonar ($p = 0.46$; *Figura 20C*).

Figura 20 - A ativação da ECA2 reduz a resposta inflamatória associada à lesão por isquemia-reperfusão.



A) Esquerda, níveis de TNF- α ; Centro, níveis de IL-6; Direita, IL-1 β após a reperfusão. B) Níveis teciduais de angiotensina II (Ang II). C) Níveis teciduais de angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4-8$). Os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey ou método de Student-Newman-Keuls, conforme apropriado. Fonte: Elaborado pelo autor.

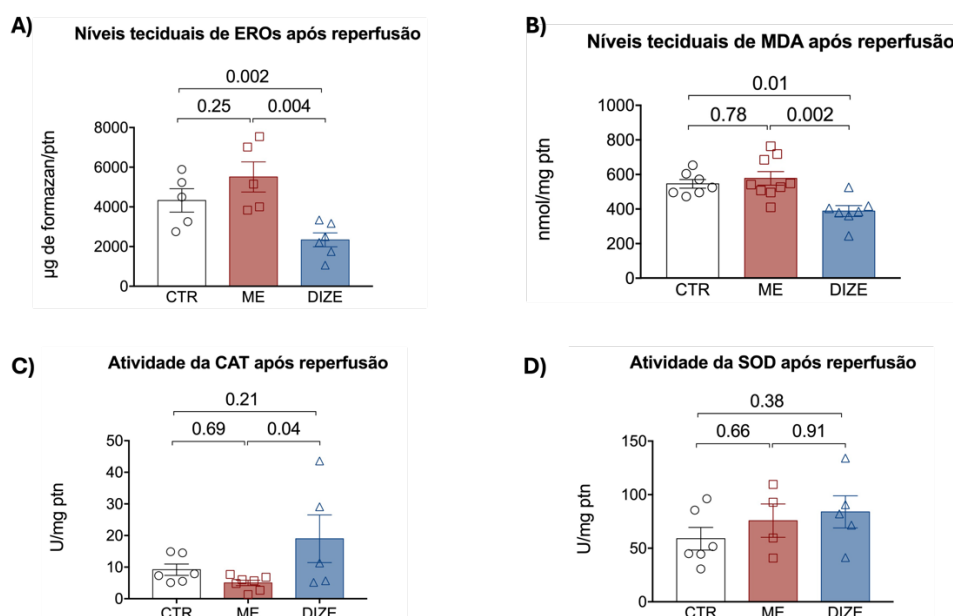
6.1.5 A ativação da ECA2 durante o manejo da morte encefálica modula o desequilíbrio redox após a reperfusão.

Visto que a produção excessiva de citocinas inflamatórias pode promover a exacerbação do desequilíbrio redox e do dano oxidativo, foram avaliados os níveis de EROs no tecido pulmonar após o transplante. Nesse sentido, níveis elevados de EROs foram observados no grupo CTR (4326 ± 588 μ g formazan/ptn) e ME (5509 ± 762 μ g formazan/ptn), enquanto o grupo DIZE (2340 ± 352 μ g formazan/ptn) apresentou uma redução nos níveis de EROs ($p = 0.004$; *Figura 21A*). Além disso, os níveis de MDA, um produto citotóxico da peroxidação

lipídica, encontraram-se reduzidos no grupo DIZE (388 ± 31.4 nmol/mg ptn) comparado com os demais grupos (CTR: 545 ± 25.1 ; ME group: 577 ± 25.1 nmol/mg ptn; $p = 0.002$; *Figura 21B*).

A atividade antioxidante da CAT aumentou 3,8x no grupo DIZE (19 ± 7.5 U/mg ptn) quando comparado ao grupo ME (5 ± 0.8 U/mg ptn; $p = 0.04$; *Figura 21C*). Não foram observadas alterações significativas nos níveis de atividade enzimática da SOD entre os grupos (CTR: 59 ± 10.5 , ME: 76 ± 15.5 , DIZE: 84 ± 15 U/mg ptn; $p = 0.39$; *Figura 21D*).

Figura 21 - A ativação da ECA2 durante o manejo da morte encefálica modula o desequilíbrio redox após a reperfusão.



A) Dosagem dos níveis EROs. B) Níveis de malondialdeído (MDA). C) Atividade da enzima catalase (CAT). D) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 5-8$) e os grupos foram testados através da análise de variância (*One-way ANOVA*) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2 ESTUDO I – DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou o papel da ativação da ECA2 no manejo de doadores de morte encefálica e seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes em modelo de transplante pulmonar em ratos (*Figura 22*).

Inicialmente, foi estabelecido um modelo de morte encefálica por meio da insuflação de um balão/cateter intracraniano. A morte encefálica foi confirmada pelo aumento abrupto e transitório da PAM, visto que o modelo animal de indução abrupta da morte encefálica converge para alterações rápidas e significativas da hemodinâmica (NEPOMUCENO et al., 2024; VAN ZANDEN et al., 2020). 3 horas após a indução da morte encefálica, período no qual a inflamação e a lesão pulmonar já estão provavelmente estabelecidas, foi administrado o aceturato de diminazeno, um reconhecido ativador da ECA2 (CHEN et al., 2021; L.A. DE MARIA et al., 2015; QARADAKHI et al., 2020; SANTOS et al., 2018). Após a administração do DIZE, os animais foram acompanhados por mais 3 horas.

Resultados do nosso estudo mostram que a ativação da ECA2 foi capaz de promover melhora da razão P/F nos animais submetidos à morte encefálica. Esta melhora na oxigenação parece estar relacionada à redução do edema e a melhora da mecânica pulmonar, como apontado pela redução da resistência tecidual e aumento da complacência do sistema respiratório.

Além de regular os processos fisiológicos supracitados, a ativação da ECA2 promoveu aumento da expressão do Nrf2. O Nrf2 é um importante fator de transcrição para elementos de resposta antioxidante, exercendo um papel fundamental no equilíbrio redox (YAMAMOTO; KENSLER; MOTOHASHI, 2018). Corroborando, estudo realizado em modelo de lesão pulmonar induzido por hiperóxia aponta para o papel da ativação da ECA2 na modulação da via do Nrf2 e a subsequente regulação positiva de enzimas antioxidantes (FANG; GAO; LIU, 2019). De maneira geral, a ativação da ECA2 parece pré-condicionar o enxerto pulmonar para os eventos oxidativos que se seguirão à lesão por reperfusão.

Em seguida, foi realizada a avaliação desses pulmões durante a reperfusão do enxerto, utilizando um modelo ortotópico de transplante pulmonar em ratos. O reestabelecimento da perfusão do enxerto pulmonar isquêmico tem sido associado a níveis elevados de Ang II, um peptídeo pró-inflamatório do SRA (KEHOE et al., 2016; WANG et al., 2021). A ativação da ECA2 durante o protocolo de morte encefálica provavelmente foi responsável pela modulação deste peptídeo durante o transplante pulmonar, uma vez que a atividade da ECA2 é responsável pela maior degradação de Ang II (SANTOS et al., 2018). O tecido pulmonar pós-reperfusão também apresentou aumento das citocinas pró-

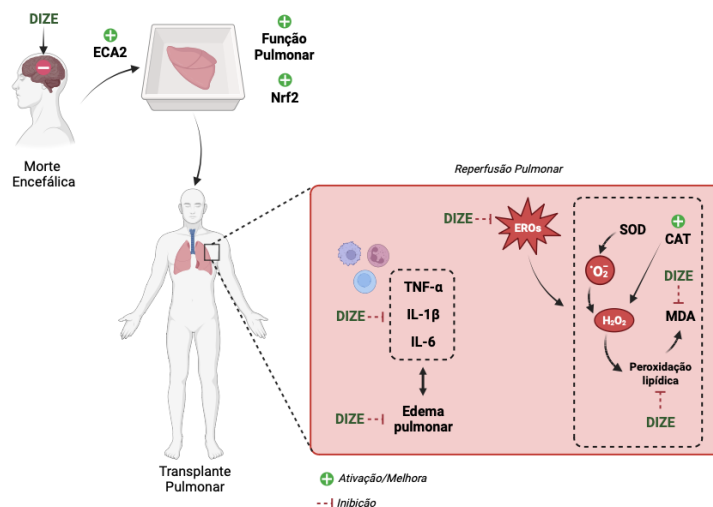
inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β , sendo prevenido pelo manejo prévio do doador de morte encefálica. Nesse contexto, estudos anteriores demonstraram os efeitos anti-inflamatórios alcançados a partir da ativação da ECA2. De maneira geral, esses estudos demonstram a participação dos ativadores da ECA2 na inibição da via do NF- κ B (FANG; GAO; LIU, 2019; WANG et al., 2021).

Durante a reperfusão, o processo inflamatório é acompanhado por uma resposta oxidativa no território pulmonar (DE PERROT et al., 2003). O desequilíbrio redox foi avaliado a partir da mensuração das concentrações de EROs e MDA, bem como da atividade enzimática da CAT e SOD. Após o transplante, o tecido pulmonar apresentou um aumento drástico nos níveis de EROs, seguido por elevação da concentração de MDA. A ativação da ECA2 bloqueou significativamente o aumento das espécies reativas, sugerindo que essa abordagem terapêutica promove um efeito antioxidante e, portanto, reduz o dano oxidativo no parênquima pulmonar.

A administração de DIZE promoveu ainda aumento da atividade da CAT, levando a maior conversão de H₂O₂ em radical hidroxila e água. Isto provavelmente reduziu a peroxidação lipídica, resultando em baixos níveis de MDA. Em suma, estes resultados corroboram com os dados de expressão de Nrf2 observado nos enxertos pulmonares previamente à reperfusão, sugerindo que a ativação da ECA2 melhorou a defesa antioxidante enzimática após reestabelecimento do fluxo sanguíneo, como evidenciado por estudos anteriores (FANG; GAO; LIU, 2019; WANG et al., 2021). Estes são resultados bastante promissores, visto que o evento de isquemia/reperfusão é frequentemente associado com desequilíbrio redox e pode predispor os pacientes transplantados à DPE (DEN HENGST et al., 2010).

É importante pontuar que o presente estudo focou apenas nas alterações agudas associadas a reperfusão pulmonar, abordagem amplamente empregada na literatura (NODA et al., 2023; OHSUMI et al., 2017, 2020). Apesar dos animais receptores terem apresentado função pulmonar estável ao longo das 2 horas de reperfusão, não foram observadas diferenças na função do enxerto entre os grupos ao final do protocolo. Portanto, para estudar se os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes associados à ativação da ECA2 persistiriam por mais tempo e se traduziriam em melhora da função pulmonar, trabalhos futuros devem utilizar modelos murinos de sobrevida.

Figura 22 - Sítios de atividade do DIZE na lesão pulmonar aguda associada ao transplante pulmonar.



Fonte: Elaborado com BioRender.com.; DIZE, aceturato de diminazeno; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; Nrf2, Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; TNF- α , Fator de necrose tumoral; IL-6, Interleucina 6; IL-1 β , Interleucina 1 beta; EROs, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; MDA, malondialdeído; $O_2^{\cdot -}$, ânion superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio.

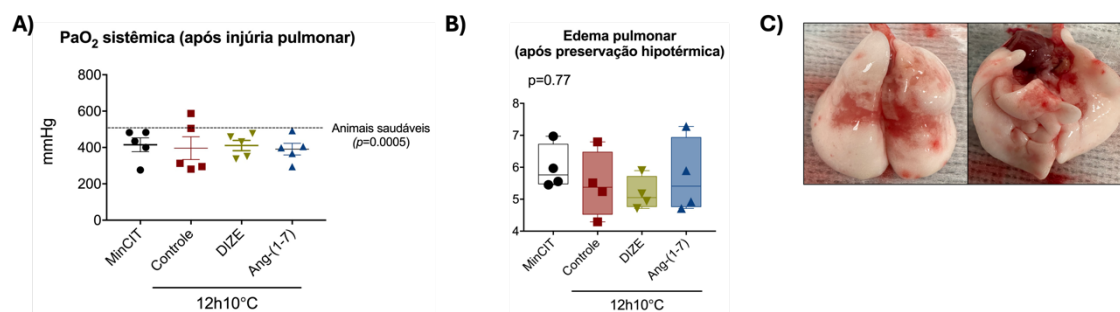
6.3 ESTUDO II – O PRECONDICIONAMENTO COM ATIVADOR DE ECA2 OU ANGIOTENSINA-(1-7) DURANTE A PRESERVAÇÃO HIPOTÉRMICA ESTÁTICA MELHORA A FUNÇÃO DO ENXERTO APÓS A REPERFUSÃO EM MODELO DE TRANSPLANTE PULMONAR.

6.3.1 Lesão pulmonar induzida por aspiração de ácido resulta na deterioração da função pulmonar do doador.

Com o objetivo de avaliar os efeitos do condicionamento do enxerto pulmonar com o ativador da ECA2 ou Ang-(1-7) durante a preservação hipotérmica estática, foi desenvolvido um modelo de lesão induzida por aspiração de ácido em roedores. Após o estabelecimento da lesão do doador, os pulmões foram randomizados para pré-condicionamento com DIZE ou Ang-(1-7) e mantidos à 10°C por 12 horas, com o pulmão esquerdo sendo imediatamente transplantado após o período de preservação. Um grupo adicional foi incluído para avaliação de condições de mínimo tempo de preservação (Figura 10).

O peso dos animais doadores foi semelhante entre os grupos (MinCIT: 311 ± 7 ; Controle: 300 ± 9 ; DIZE: 306 ± 13 ; Ang-(1-7): 304 ± 11 g; $p = 0.86$). Para estabelecimento da lesão pulmonar, foi realizada instilação traqueal de ácido HCl (0.1N; 0.4 mL). Após a administração do ácido, o animal doador foi estabilizado e mantido em ventilação espontânea por um período de 4 horas, sendo a avaliação realizada imediatamente antes da extração pulmonar. A PaO_2 de animais doadores saudáveis foi de 501 ± 6 mmHg, caindo para níveis de 402 ± 23 mmHg para todos os animais incluídos no estudo após 4 horas da lesão aspirativa ($p = 0.0005$). Não foram encontradas diferenças quando comparados os valores da PaO_2 sistêmica (MinCIT: 415 ± 38 ; Controle: 396 ± 63 ; DIZE: 411 ± 28 ; Ang-(1-7): 391 ± 32 mmHg; $p = 0.92$; *Figura 23A*) e no edema pulmonar (MinCIT: 6 ± 0.3 ; Controle: 5.5 ± 0.5 ; DIZE: 5.2 ± 0.2 ; Ang-(1-7): 5.7 ± 0.6 ; $p = 0.75$; *Figura 23B*) entre os 4 grupos submetidos a lesão. Imagem representativa dos pulmões após captação é apresentada na *Figura 23C*.

Figura 23. Lesão pulmonar induzida por aspiração de ácido resulta na deterioração da função pulmonar do doador.



A) Oxigenação sistêmica. B) Edema após preservação hipotérmica. C) Imagem macroscópica representativa do bloco pulmonar após lesão aspirativa. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4-5$). Para dados com distribuição normal foi aplicado *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, já para os não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para análise de múltiplas comparações. Foi considerado um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3.2 O enriquecimento da solução de preservação com DIZE ou angiotensina-(1-7) durante a preservação hipotérmica resulta na melhora da função do enxerto após o transplante pulmonar.

Depois que os pulmões doados foram alocados para suas condições específicas de lavagem anterógrada e preservação hipotérmica, foi realizado o transplante unilateral à esquerda nos animais receptores. As características basais dos receptores e os fatores operatórios foram semelhantes entre os grupos estudados (*Tabela 8*).

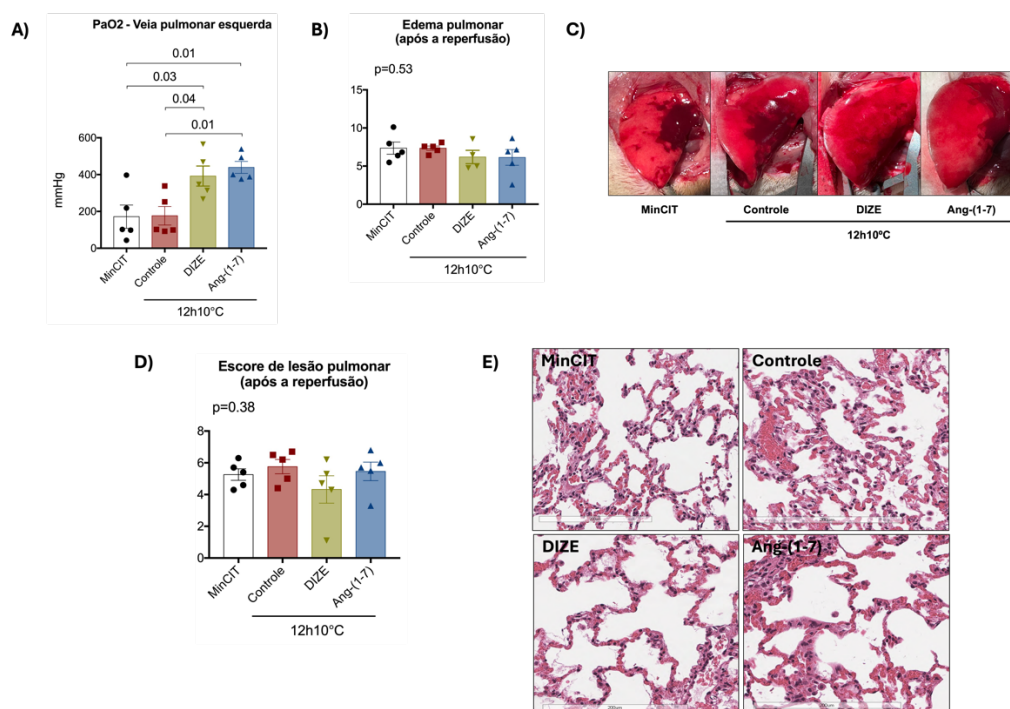
Após o implante, os enxertos pulmonares foram submetidos à um período de 2 horas de reperfusão. Este intervalo de acompanhamento é crítico para a avaliação da qualidade do enxerto após o período de preservação. Ao final do período de reperfusão, a veia pulmonar esquerda foi puncionada para avaliação do desempenho do pulmão esquerdo transplantado. Durante a reperfusão, os pulmões lavados com DIZE (392 ± 54 mmHg) e Ang-(1-7) (439 ± 32 mmHg) e armazenados à 10°C apresentaram melhor função do enxerto quando comparados aos grupos MinCIT (172 ± 63 mmHg) e Controle (177 ± 50 mmHg) ($p = 0.002$; *Figura 24A*). Não foram observadas diferenças nos índices de edema pulmonar entre os grupos (MinCIT: 7.3 ± 0.8 ; Controle: 7.3 ± 0.3 ; DIZE: 6.2 ± 0.8 ; Ang-(1-7): 6.1 ± 1 ; $p = 0.53$; *Figura 24B*). Imagem representativa dos pulmões após reperfusão é apresentada na *Figura 24C*. Não foram observadas diferenças nos escores de lesão pulmonar entre os grupos ($p = 0.38$; *Figura 24D,E*).

Tabela 8. Características basais dos animais receptores e fatores operatórios.

Grupo/Parâmetro	Gelo	Preservação (12 horas à 10°C)			Valor-p
	MinCIT	Controle	DIZE	Ang-(1-7)	
Peso, g	330 ± 7	313 ± 8	340 ± 8	326 ± 11	0.5
PaO_2 , mmHg	498 ± 8	507 ± 12	490 ± 9	499 ± 15	0.8
Preparo do bloco, min	36 ± 5	42 ± 5	42 ± 4	40 ± 6	0.5
Tempo de implante, min	33 ± 12	36 ± 15	29 ± 2	29 ± 5	0.6

Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (*One-way ANOVA*) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. PaO_2 , pressão arterial de oxigênio (FiO_2 1.0); Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 - O enriquecimento da solução de preservação com DIZE ou angiotensina-(1-7) durante a preservação hipotérmica resulta na melhora da função do enxerto após o transplante pulmonar.



A) Oxigenação a partir da veia pulmonar do enxerto. B) Edema após reperfusão. C) Imagem macroscópica representativa do enxerto pulmonar após 2 horas de reperfusão. D,E) Fotomicrografia representativa de segmentos pulmonares de ratos corados com H&E juntamente com escores de lesão pulmonar (barra de escala = 200 μ m). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n = 4-5). Para dados com distribuição normal foi aplicado *One-way ANOVA* com pós-teste de Tukey. Foi considerado um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Fonte: Elaborado pelo autor.

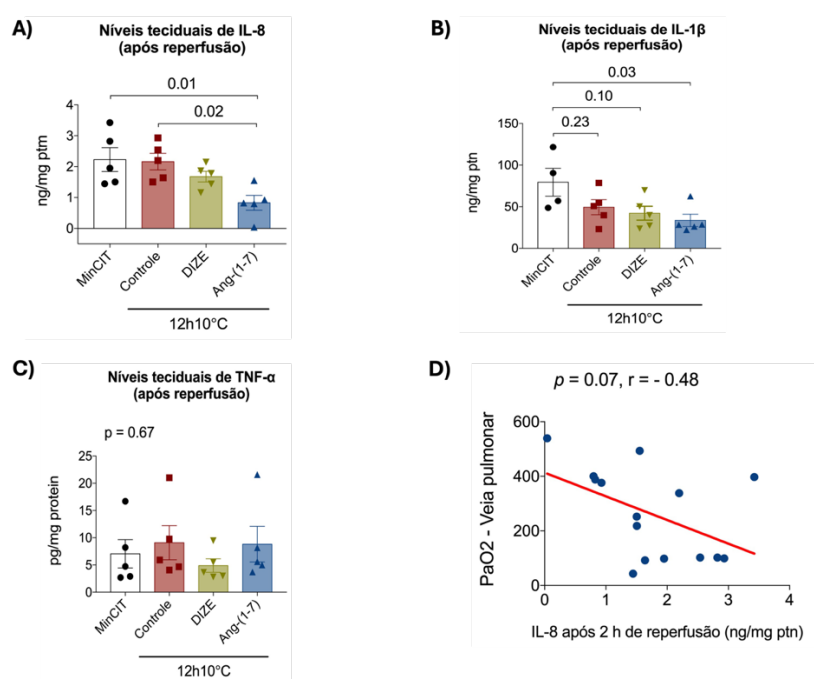
6.3.3 O pré-condicionamento com angiotensina-(1-7) durante a preservação hipotérmica atenua as respostas inflamatórias associadas a reperfusão do enxerto.

A lesão por aspiração tem sido correlacionada com a ativação dos complexos de inflamassoma intracelular, seguida pela liberação de potentes citocinas inflamatórias. Nesse contexto, foram avaliadas as concentrações de IL-8, IL-1 β e TNF- α .

Os níveis de IL-8 no tecido pulmonar foram significativamente mais baixos no grupo Ang-(1-7) (MinCIT: 2.2 ± 0.4 ; Controle: 2.1 ± 0.3 ; DIZE: 1.6 ± 0.1 ; Ang-(1-7): 0.8 ± 0.2 ng/mg ptn; $p = 0.01$; *Figure 25A*). Além disso, a preservação hipotérmica tende a reduzir os níveis de IL-1 β após a reperfusão pulmonar (MinCIT: 79 ± 17 ; Controle: 49 ± 9 ; DIZE: 42 ± 8 ng/mg ptn; $p = 0.23$). O pré-condicionamento com Ang-(1-7) foi capaz de amplificar significativamente essa resposta (34 ± 7 ng/mg ptn; $p = 0.03$; *Figura 25B*). Não foram observadas diferenças nas concentrações de TNF- α entre os grupos (MinCIT: 7 ± 3 ; Controle: 9 ± 3 ; DIZE: 5 ± 1 ; Ang-(1-7): 9 ± 3 ng/mg ptn; $p = 0.67$; *Figure 25C*).

Por fim, nossos dados sugerem que os níveis de IL-8 tendem a correlacionar-se negativamente com a oxigenação do enxerto pulmonar (*Figura 25D*).

Figura 25 - O pré-condicionamento com angiotensina-(1-7) durante a preservação hipotérmica atenua as respostas inflamatórias associadas a reperfusão do enxerto.



A) Níveis teciduais de IL-8 após reperfusão. (B) Níveis teciduais de IL-1 β após reperfusão. C) Níveis teciduais de TNF- α após reperfusão. D) Correlação entre os níveis de IL-8 e função do enxerto pulmonar. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 5$). Os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3.4 O enriquecimento da solução de preservação com angiotensina-(1-7) durante a preservação hipotérmica promove citoproteção.

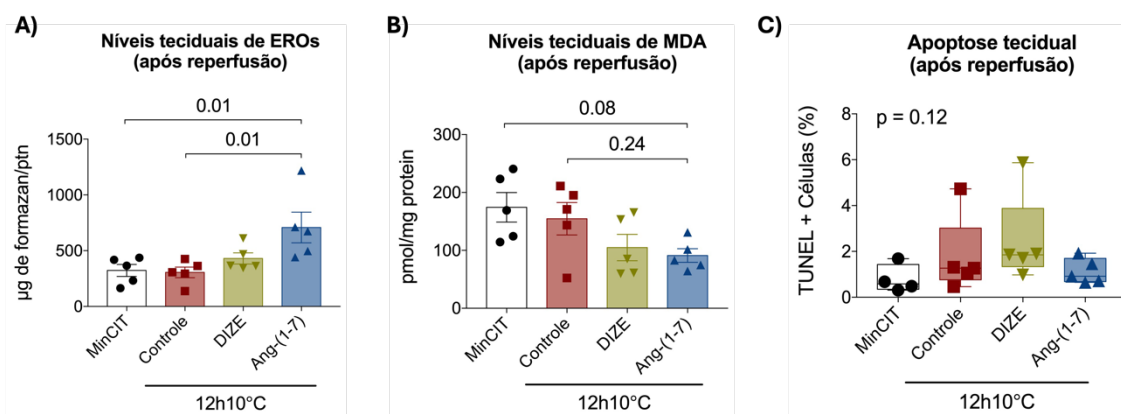
Visto que a ativação do inflamassoma e a geração de EROs são suprimidas quando a atividade mitocondrial encontrasse desregulada, foram avaliadas as concentrações de espécies reativas e a dinâmica da rede mitocondrial. Logo, níveis elevados de EROs foram observados no grupo Ang-(1-7) quando comparado ao grupo MinCIT e controle (MinCIT: 323 ± 53 ; Controle: 305 ± 48 ; DIZE: 430 ± 50 ; Ang-(1-7): 708 ± 137 μg formazan/mg ptn; $p = 0.01$; *Figura 26A*).

O dano pulmonar está associado a níveis elevados de EROs e tem sido implicado nas alterações inflamatórias induzidas pela LIR. Com base no comentado, as concentrações teciduais de MDA pós-reperfusão foram aferidas. Curiosamente, os níveis de MDA tendem a ser reduzidos no grupo Ang-(1-7) em comparação ao grupo MinCIT e Controle (MinCIT: 174 ± 25 ; Controle: 155 ± 28 ; DIZE: 105 ± 23 ; Ang-(1-7): 91 ± 12 pmol/mg ptn; $p = 0.06$; *Figura 26B*).

A transdução de sinais por meio das EROs desempenha um papel crítico na modulação da autofagia/mitofagia. Para avaliar o papel da biogênese mitocondrial nos 4 grupos de preservação, foram realizadas análises da expressão gênica de marcadores de biogênese mitocondrial no tecido pulmonar após perfusão. Os resultados dessa análise apontam para o aumento significativo da expressão de PPARGc1B ($p = 0.02$; *Tabela 9*) no grupo condicionado com Ang-(1-7) em relação ao grupo MinCIT. Além disso, a lavagem anterógrada pulmonar com Ang-(1-7) tende a promover maior expressão de TFAM (*Tabela 9*), gene essencial para a manutenção do DNA mitocondrial. Finalmente, MFF, FIS1 e PINK1, genes que codificam para fissão mitocondrial, tendem a ser positivamente regulados no grupo Ang-(1-7) comparado aos demais grupos do estudo (*Tabela 9*).

Após a análise do painel mitocondrial, foram avaliadas as diferenças na morte celular entre as condições distintas de condicionamento dos enxertos pulmonares. Nesse sentido, não foram observadas diferenças nos níveis de apoptose entre os grupos ($p = 0.12$; *Figura 26C*).

Figura 26 - O enriquecimento da solução de preservação com angiotensina-(1-7) durante a preservação hipotérmica promove citoproteção.



A) Níveis teciduais de EROs após reperfusão. B) Níveis teciduais de MDA após reperfusão. C) Quantificação da apoptose celular no tecido pulmonar após reperfusão. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4-5$). Para dados com distribuição normal foi aplicado *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, já para os não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para análise de múltiplas comparações. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9. Número de aumento de vezes dos marcadores de expressão gênica mitocondrial tecidual após pré-condicionamento com Ang-(1-7) e reperfusão pulmonar.

Fatores envolvidos na	Ang-(1-7)	relativo ao MinCIT		relativo ao Controle	
	Símbolo	Aumento	Valor-p	Aumento	Valor-p
Biogênese Mitocondrial	<i>PPARG</i>	3.80	0.45	1.53	0.30
	<i>PPARGc1A</i>	-3.00	0.34	1.71	0.29
	<i>PPARGc1B</i>	4.60	0.02*	1.41	0.77
	<i>TFAM</i>	7.31	0.17	1.42	0.12
Fusão Mitocondrial	<i>MFN1</i>	-1.28	0.34	-4.92	0.34
	<i>MFN2</i>	7.77	0.30	2.21	0.24
	<i>OPA1</i>	6.09	0.29	2.17	0.20
Fissão Mitocondrial	<i>MFF</i>	8.77	0.15	2.10	0.12
	<i>FIS1</i>	8.16	0.27	1.89	0.08
Mitofagia	<i>PARK2</i>	2.26	0.86	1.37	0.44
	<i>PINK1</i>	8.21	0.18	2.51	0.15

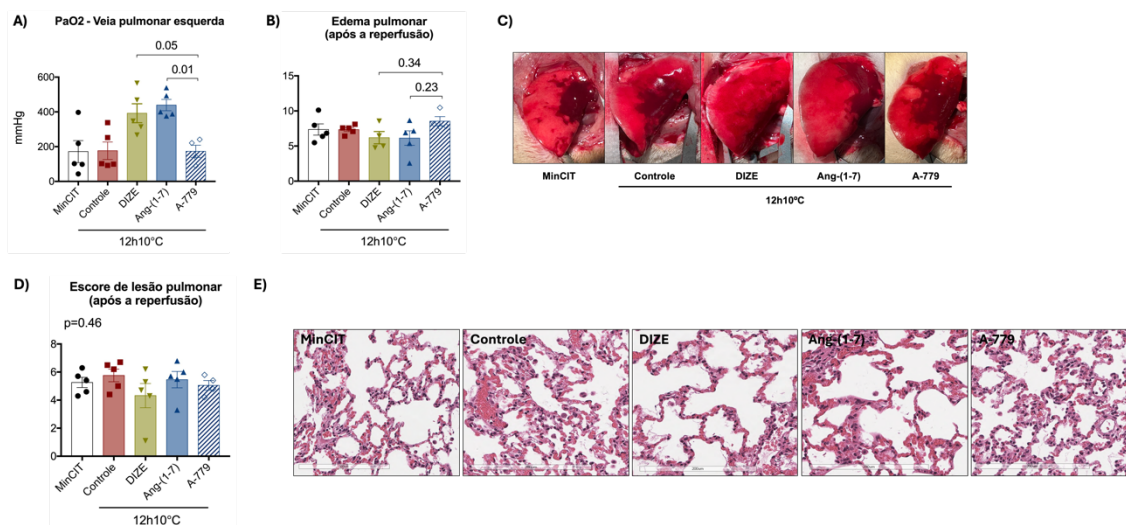
PPARG, receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama. TFAM, fator de transcrição mitocondrial A. MFN1, mitofusina 1. MFN2, mitofusina 2. OPA1, homólogo de atrofia óptica 1 (humano). MFF, fator de fissão mitocondrial. FIS1, fissão 1 (membrana externa mitocondrial). PARK2, doença de Parkinson 2, parkin. PINK1, PTEN quinase induzida 1. PPARGC1A, receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama, coativador 1 alfa. PPARGC1B, receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama, coativador 1 beta. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

6.3.5 A melhora da função do enxerto pulmonar após o condicionamento com angiotensina-(1-7) é dependente da ativação do receptor Mas.

Com o objetivo de investigar se os efeitos benéficos da Ang-(1-7) observados anteriormente decorrem da ativação do receptor Mas, um grupo adicional foi incluído e pré-condicionado com o antagonista A-779 (Cat#SML1370, A-779 sal trifluoroacetato, Millipore Sigma) mais Ang-(1-7). Após a preservação hipotérmica (12 horas à 10°C), o transplante pulmonar unilateral esquerdo foi realizado e a função do enxerto avaliada.

Na presença do antagonista, o efeito protetor da Ang-(1-7) na oxigenação foi reduzido significativamente (Ang-(1-7): 439 ± 32 vs. A-779: 173 ± 35 mm Hg; $p = 0.01$; *Figura 27A*). Este resultado indica que o fenótipo observado anteriormente é dependente da ativação do receptor Mas. O edema após a reperfusão tendeu a ser maior após a inibição do receptor em comparação ao grupo somente condicionado com Ang-(1-7) [Ang-(1-7): 6 ± 1 vs. A-779: 8.5 ± 0.6 ; $p = 0.17$; *Figura 27B*]. Imagem representativa dos pulmões após inibição do receptor Mas e reperfusão do enxerto é apresentada na *Figura 27C*. Não foram observadas diferenças nos escores de lesão pulmonar entre os grupos ($p = 0.46$; *Figura 27D,E*).

Figura 27 - A melhora da função do enxerto pulmonar após o condicionamento com angiotensina-(1-7) é dependente da ativação do receptor Mas.



A) Oxigenação a partir da veia pulmonar do enxerto. B) Edema após reperusão. C) Imagem macroscópica representativa do enxerto pulmonar após 2 horas de reperusão. D,E) Fotomicrografia representativa de segmentos pulmonares de ratos corados com H&E juntamente com escores de lesão pulmonar (barra de escala = 200 μ m). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n = 4-5). Para dados com distribuição normal foi aplicado One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Foi considerado um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.4 ESTUDO II – DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que o enriquecimento da solução de preservação pulmonar com o ativador da ECA2 ou com a Ang-(1-7) resulta na melhora da função do enxerto após o transplante, amplificando os efeitos benéficos da preservação hipotérmica em pulmões lesionados e submetidos à modelo de transplante em ratos (*Figura 28*).

Primeiramente, foi estabelecido um modelo animal de pneumonite aspirativa. A lesão pulmonar por meio da instilação intratraqueal de ácido foi confirmada pela queda da PaO₂. As lesões induzidas por este modelo apresentam comportamento bifásico, com as principais alterações da oxigenação sistêmica e no edema pulmonar ocorrendo nas primeiras 4 horas após administração da solução de HCl (SETZER et al., 2018).

Em seguida, foi realizada a exposição do bloco cardiopulmonar e à alocação dos pulmões lesionados em diferentes estratégias de condicionamento do enxerto. Os resultados deste estudo demonstraram que os enxertos lesionados, lavados com solução de preservação enriquecida com DIZE ou Ang-(1-7) e armazenados por 12 horas à 10°C, apresentaram melhor função pulmonar após o transplante em comparação aos pulmões lavados com solução de preservação padrão seguida de preservação hipotérmica ou transplante imediato. Este efeito benéfico parece ser mediado por um receptor específico para Ang-(1-7), uma vez que o condicionamento com o seu respectivo antagonista aboliu a melhora da oxigenação.

Corroborando, a administração intraperitoneal de DIZE e intravenosa de Ang-(1-7) já demonstrou ser capaz de melhorar a oxigenação em modelo animal de LIR e em modelo de lesão pulmonar induzida por instilação de ácido, respectivamente (WANG et al., 2021; ZAMBELLI et al., 2015). Ainda, a suplementação da solução de preservação com captopril foi capaz de melhorar a LIR durante protocolo de transplante pulmonar em ratos (FISCHER et al., 2000). Além dos efeitos diretos do bloqueio da ECA, é importante pontuar que a inibição dessa enzima pode promover aumento indireto dos níveis plasmáticos e teciduais de Ang-(1-7) (ROKS et al., 1999).

Como evidenciado por estudos anteriores, a função do enxerto tem sido associada aos níveis de citocinas pró-inflamatórias, com os níveis de IL-8 correlacionando-se com a função pulmonar após 2 horas de reperfusão (DE PERROT et al., 2002; FISHER et al., 2001). Curiosamente, os níveis de IL-8 estavam reduzidos no tecido pulmonar dos enxertos pré-condicionados com Ang-(1-7) em comparação com os demais. Além disso, os dados do presente trabalho sugerem que a oxigenação do enxerto se correlaciona negativamente com os níveis de IL-8. O tecido pulmonar dos pulmões previamente submetidos à preservação hipotérmica também apresentou redução dos níveis de IL-1 β , consistente com dados previamente publicados na literatura (ABDELNOUR-BERCHTOLD et al., 2022; ALI et al., 2021).

A produção excessiva de fatores pró-inflamatórios associados ao pulmão lesionado podem agravar o dano oxidativo e mitocondrial observado na LIR, resultando em desregulação da dinâmica mitocondrial e apoptose celular (ABDELNOUR-BERCHTOLD et al., 2022; POKHAREL et al., 2024).

Surpreendentemente, os níveis de EROs no tecido pulmonar estavam aumentados após o condicionamento com Ang-(1-7). Essas espécies reativas estão geralmente associadas ao desequilíbrio redox e tem sido implicadas no evento de peroxidação lipídica, o que poderia contribuir para o processo inflamatório e a apoptose induzida pela LIR (ABDELNOUR-BERCHTOLD et al., 2022; POKHAREL et al., 2024). No entanto, ao avaliarmos as concentrações de MDA, os enxertos pré-condicionados com Ang-(1-7) apresentaram uma redução desse produto citotóxico, não impactando no processo de apoptose celular. Estes achados sugerem que este peptídeo do eixo protetor do SRA apresenta efeito antioxidante e atua reduzindo o dano oxidativo após a reperfusão, em linha com estudos publicados anteriormente (FANG; GAO; LIU, 2019; SANTOS et al., 2018; SHENG et al., 2024).

O aumento dos níveis intracelulares de EROs não está relacionado apenas ao dano celular, mas tem sido sugerida sua participação como segundo mensageiro em diferentes vias de sinalização, como na regulação da dinâmica funcional das mitocôndrias (DUDEK, 2017; PIANTADOSI; SULIMAN, 2012). Por exemplo, as EROs mitocondriais podem levar ao aumento da atividade de enzimas heme oxigenase que controlam a ativação de fatores nucleares envolvidos na regulação da atividade de enzimas antioxidantes e que mantêm a expressão de genes relacionados a biogênese mitocondrial. Com base no exposto, o presente trabalho mostrou que enxertos tratados com Ang-(1-7) demonstraram aumento da regulação de PPARGc1B e de TFAM, genes envolvidos na biogênese mitocondrial e que participarão da transcrição de proteínas que regulam processos redox e anti-inflamatórios (PIANTADOSI; SULIMAN, 2012; POKHAREL et al., 2024).

Assim como no estudo I, esta segunda etapa focou apenas nas alterações agudas associadas a reperfusão pulmonar. Estudos futuros devem ser realizados para observar se os benefícios do enriquecimento da solução de preservação com DIZE ou Ang-(1-7) persistiriam por longos intervalos de tempo e para avaliar alterações crônicas associadas ao transplante pulmonar. É importante pontuar ainda que, apesar da melhora da função do enxerto associada ao condicionamento com o ativador da ECA2, os efeitos protetores avaliados através de análises biomoleculares parecem ter sido menos proeminentes quando comparados aos do tratamento com Ang-(1-7). Logo,

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram pela primeira vez os efeitos da modulação do eixo protetor do sistema renina-angiotensina na prevenção da lesão pulmonar aguda em modelos experimentais de transplante pulmonar. A modulação desse eixo, seja pela ativação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) ou administração de angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], compreendeu dois diferentes cenários: durante o manejo da morte encefálica e após estabelecimento de modelo animal de pneumonite aspirativa.

Os achados do Estudo I, que avaliou o impacto da ativação da ECA2 durante o manejo da morte encefálica e sua repercussão após o transplante pulmonar, relevaram que: O modelo animal de morte encefálica é acompanhado por comprometimento significativo da função pulmonar, refletido pelas alterações gasométricas, provavelmente originadas a partir do edema pulmonar e perivascular estabelecido. A ativação da ECA2, por sua vez, foi capaz de melhorar a qualidade do enxerto pulmonar, demonstrada pela redução do edema e melhora das propriedades elásticas e resistivas do sistema respiratório, que juntas podem ter convergido para a melhora da função pulmonar observada previamente ao transplante. Contudo, apesar de sua participação na redução dos níveis de citocinas inflamatórias e melhora do perfil redox, a ativação prévia da ECA2 não resultou em aprimoramento da função precoce do enxerto pós-transplante, indicando a necessidade de intervenções adicionais para otimização de resultados após o período de reperfusão.

No Estudo II, delineado com o objetivo de avaliar os efeitos do pré-condicionamento com o ativador de ECA2 ou Ang-(1-7) durante a preservação hipotérmica estática de pulmões previamente lesionados por aspiração de ácido, foi demonstrado que: A lesão pulmonar induzida por aspiração de ácido clorídrico causou deterioração da função dos pulmões destinados à doação, observado pela redução da tensão arterial de oxigênio. O enriquecimento da solução de preservação com o ativador da ECA2 ou Ang-(1-7) durante a preservação hipotérmica resultou em melhora significativa da função precoce do enxerto pós-transplante pulmonar, evidenciada pela melhora da oxigenação. É importante destacar que o pré-condicionamento com Ang-(1-7) mostrou maior eficácia na atenuação das respostas inflamatórias associadas à reperfusão do

enxerto, o que pode ter corroborado para citoproteção e manutenção da integridade do parênquima pulmonar observadas após o transplante.

Em conjunto, os resultados sugerem que a modulação do eixo protetor do sistema renina-angiotensina através da ativação da ECA2 ou administração de Ang-(1-7), possui potencial terapêutico promissor na melhora da viabilidade e função dos enxertos previamente submetidos a cenários de morte encefálica e/ou de lesões aspirativas. Essas intervenções farmacológicas representam uma abordagem inovadora para o manejo de doadores e a preservação de enxertos pulmonares, contribuindo para o aumento da disponibilidade de órgãos viáveis para o transplante e, conseqüentemente, para melhores desfechos clínicos nos receptores de transplante pulmonar.

REFERÊNCIAS

ABDELNOUR-BERCHTOLD, Etienne et al. Evaluation of 10°C as the optimal storage temperature for aspiration-injured donor lungs in a large animal transplant model. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, [S. l.], v. 41, n. 12, p. 1679–1688, 2022. DOI: 10.1016/j.healun.2022.08.025.

ABREU, Marcus da Matta; PAZETTI, Rogerio; ALMEIDA, Francine Maria De; CORREIA, Aristides Tadeu; PARRA, Edwin Roger; SILVA, Laís Pereira Da; VIEIRA, Rodolfo de Paula; PÊGO-FERNANDES, Paulo Manuel; JATENE, Fabio Biscegli. Methylene blue attenuates ischemia–reperfusion injury in lung transplantation. **Journal of Surgical Research**, [S. l.], v. 192, n. 2, p. 635–641, 2014. DOI: 10.1016/j.jss.2014.07.043.

ADATIA, Ian; LILLEHEI, Craig; ARNOLD, John H.; THOMPSON, John E.; PALAZZO, Regina; FACKLER, James C.; WESSEL, David L. Inhaled nitric oxide in the treatment of postoperative graft dysfunction after lung transplantation. **The Annals of Thoracic Surgery**, [S. l.], v. 57, n. 5, p. 1311–1318, 1994. DOI: 10.1016/0003-4975(94)91382-X.

AEBI, Hugo. Catalase in vitro. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.

AFONSO JÚNIOR, José Eduardo; WEREBE, Eduardo de Campos; CARRARO, Rafael Medeiros; TEIXEIRA, Ricardo Henrique de Oliveira Braga; FERNANDES, Lucas Matos; ABDALLA, Luis Gustavo; SAMANO, Marcos Naoyuki; PÊGO-FERNANDES, Paulo Manuel. Lung transplantation. **Einstein (São Paulo)**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 297–304, 2015. DOI: 10.1590/S1679-45082015RW3156.

AIGNER, Clemens et al. Treatment of primary graft dysfunction after lung transplantation with orally inhaled AP301: A prospective, randomized pilot study. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 225–231, 2018. DOI: 10.1016/j.healun.2017.09.021.

ALEXIS CARREL. The surgery of blood vessels. **Johns Hopkings Hospital Bull**, [S. l.], v. 18, p. 18–28, 1907.

ALI, Aadil et al. Static lung storage at 10°C maintains mitochondrial health and preserves donor organ function. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 13, n. 611, 2021. DOI: 10.1126/scitranslmed.abf7601.

ALMEIDA, Francine Maria et al. Creatine supplementation attenuates pulmonary and systemic effects of lung ischemia and reperfusion injury. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 242–250, 2016. DOI: 10.1016/j.healun.2015.06.012.

ANTUS, Balazs; SEBE, Attila; FILLINGER, Janos; JENEY, Csaba; HORVATH, Ildiko. Effects of Blockade of the Renin–Angiotensin and Endothelin Systems on Experimental Bronchiolitis Obliterans. **The Journal of Heart and Lung**

Transplantation, [S. l.], v. 25, n. 11, p. 1324–1329, 2006. DOI: 10.1016/j.healun.2006.08.007.

ASTP, ATS, ERS. International Guidelines for the Selection of Lung Transplant Candidates. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 158, n. 1, p. 335–339, 1998. DOI: 10.1164/ajrccm.158.1.15812.

AVLONITIS, Vassilios S.; WIGFIELD, Christopher H.; KIRBY, John A.; DARK, John H. The Hemodynamic Mechanisms of Lung Injury and Systemic Inflammatory Response Following Brain Death in the Transplant Donor. **American Journal of Transplantation**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 684–693, 2005. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2005.00755.x.

BANNISTER, Joe V.; BANNISTER, William H.; ROTILIO, Giuseppe. Aspects of the Structure, Function, and Applications of Superoxide Dismutase. **Critical Reviews in Biochemistry**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 111–180, 1987. DOI: 10.3109/10409238709083738.

BELHAJ, Asmae et al. Mechanical versus humoral determinants of brain death-induced lung injury. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. e0181899, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0181899.

BHARAT, Ankit et al. Lung transplantation for patients with severe COVID-19. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 574, 2020. DOI: 10.1126/scitranslmed.abe4282.

BISCEGLI JATENE, Fábio; MANUEL, Paulo; FERNANDES, Pêgo; LOPES DE MEDEIROS, Israel. **Transplante pulmonar Lung transplantation Rev Med**. [s.l.: s.n.].

BOS, Saskia; VOS, Robin; VAN RAEMDONCK, Dirk E.; VERLEDEN, Geert M. Survival in adult lung transplantation: where are we in 2020? **Current opinion in organ transplantation**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 268–273, 2020. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000753.

BRACKEN, Christopher A.; GURKOWSKI, Mary Ann; NAPLES, Joseph J. Lung transplantation: Historical perspective, current concepts, and anesthetic considerations. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 220–241, 1997. DOI: 10.1016/S1053-0770(97)90220-2.

BUSL, Katharina M.; BLECK, Thomas P. Neurogenic Pulmonary Edema. **Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 43, n. 8, p. 1710–1715, 2015. DOI: 10.1097/CCM.0000000000001101.

CAMILA KOSACHENCO. **Primeiro transplante de pulmão da América Latina completa 30 anos**. 2019.

CAO, Yongmei; LIU, Yujing; SHANG, Jiawei; YUAN, Ziming; PING, Feng; YAO, Sijia; GUO, Yong; LI, Yingchuan. Ang-(1-7) treatment attenuates

lipopolysaccharide-induced early pulmonary fibrosis. **Laboratory Investigation**, [S. l.], v. 99, n. 12, p. 1770–1783, 2019. DOI: 10.1038/s41374-019-0289-7.

CATANIA, Anna; LONATI, Caterina; SORDI, Andrea; GATTI, Stefano. Detrimental consequences of brain injury on peripheral cells. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S. l.], v. 23, n. 7, p. 877–884, 2009. DOI: 10.1016/j.bbi.2009.04.006.

CEULEMANS, Laurens J.; INCI, Ilhan; VAN RAEMDONCK, Dirk. Lung donation after circulatory death. **Current Opinion in Organ Transplantation**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 288–296, 2019. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000627.

CHAMBERS, Daniel C. et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Lung And Heart-Lung Transplantation Report—2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 1047–1059, 2017. DOI: 10.1016/j.healun.2017.07.016.

CHANEY, John; SUZUKI, Yoshikazu; CANTU, Edward; VAN BERKEL, Victor. Lung donor selection criteria. **Journal of thoracic disease**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 1032–8, 2014. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.24.

CHEN, I. Chen; LIN, Jao-Yu; LIU, Yi-Ching; CHAI, Chee-Yin; YEH, Jwu-Lai; HSU, Jong-Hau; WU, Bin-Nan; DAI, Zen-Kong. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activator Ameliorates Severe Pulmonary Hypertension in a Rat Model of Left Pneumectomy Combined With VEGF Inhibition. **Frontiers in Medicine**, [S. l.], v. 8, 2021. DOI: 10.3389/fmed.2021.619133.

CHIMENTI, Laura et al. Comparison of direct and indirect models of early induced acute lung injury. **Intensive Care Medicine Experimental**, [S. l.], v. 8, n. S1, p. 62, 2020. DOI: 10.1186/s40635-020-00350-y.

COBELENS, Pieter M.; TIEBOSCH, Ivo ACW; DIJKHUIZEN, Rick M.; VAN DER MEIDE, Peter H.; ZWARTBOL, René; HEIJNEN, Cobi J.; KESECIOGLU, Jozef; VAN DEN BERGH, Walter M. Interferon- β attenuates lung inflammation following experimental subarachnoid hemorrhage. **Critical Care**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. R157, 2010. DOI: 10.1186/cc9232.

CORREIA, Cristiano de Jesus; COUTINHO E SILVA, Raphael dos Santos; SOARES, Rafaela Garcia Ferreira; ARMSTRONG, Roberto; RICARDO-DASILVA, Fernanda Yamamoto; SANNOMIYA, Paulina; BREITHAUPT-FALOPPA, Ana Cristina; MOREIRA, Luiz Felipe P. Hypertonic saline reduces cell infiltration into the lungs after brain death in rats. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 61, p. 101901, 2020. DOI: 10.1016/j.pupt.2020.101901.

CYPEL, Marcelo; KESHAVJEE, Shaf. When to consider lung transplantation for COVID-19. **The Lancet Respiratory Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 944–946, 2020. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30393-3.

DAVIDSON, Bruce A.; KNIGHT, Paul R.; HELINSKI, Jadwiga D.; NADER, Nader D.; SHANLEY, Thomas P.; JOHNSON, Kent J. The Role of Tumor Necrosis Factor- α in the Pathogenesis of Aspiration Pneumonitis in Rats. **Anesthesiology**, [S. l.], v. 91, n. 2, p. 486–499, 1999. DOI: 10.1097/00000542-199908000-00024.

DAVISON, D. L.; TEREK, M.; CHAWLA, L. S. Neurogenic Pulmonary Edema. *Em: Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine 2012*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 471–480. DOI: 10.1007/978-3-642-25716-2_43.

DE CARVALHO SANTUCHI, Melissa et al. Angiotensin-(1-7) and Alamandine Promote Anti-inflammatory Response in Macrophages *In Vitro* and *In Vivo*. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 2019, p. 1–14, 2019. DOI: 10.1155/2019/2401081.

DE PERROT, Marc; LIU, Mingyao; WADDELL, Thomas K.; KESHAVJEE, Shaf. Ischemia–Reperfusion–induced Lung Injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 167, n. 4, p. 490–511, 2003. DOI: 10.1164/rccm.200207-670SO.

DE PERROT, Marc; QUADRI, Syed M.; IMAI, Yumiko; KESHAVJEE, Shaf. Independent Ventilation of the Graft and Native Lungs *In Vivo* After Rat Lung Transplantation. **The Annals of Thoracic Surgery**, [S. l.], v. 79, n. 6, p. 2169–2171, 2005. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2004.01.043.

DE SOUZA-NETO, Fernando Pedro; CARVALHO SANTUCHI, Melissa; DE MORAIS E SILVA, Mario; CAMPAGNOLE-SANTOS, Maria José; DA SILVA, Rafaela Fernandes. Angiotensin-(1–7) and Alamandine on Experimental Models of Hypertension and Atherosclerosis. **Current Hypertension Reports**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 17, 2018. DOI: 10.1007/s11906-018-0798-6.

DEMIKHOV, V. P. **Experimental transplantation of vital organs**. New York: Consultants Bureau, 1962.

DEN HENGST, Willem A.; GIELIS, Jan F.; LIN, Judy Y.; VAN SCHIL, Paul E.; DE WINDT, Leon J.; MOENS, An L. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 299, n. 5, p. H1283–H1299, 2010. DOI: 10.1152/ajpheart.00251.2010.

DE PERROT, MARC; SEKINE, YASUO; FISCHER, STEFAN; WADDELL, THOMAS K.; MCRAE, KAREN; LIU, MINGYAO; WIGLE, DENNIS A.; KESHAVJEE, SHAF. Interleukin-8 Release during Early Reperfusion Predicts Graft Function in Human Lung Transplantation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 165, n. 2, p. 211–215, 2002. DOI: 10.1164/ajrccm.165.2.2011151.

DEROM, F. ; BARBIER, F. ; RINGOIR, S. ;. et al. Ten-month survival after lung homotransplantation in man. **J Thorac Cardiovasc Surg**, [S. l.], v. 61, p. 835–846, 1971.

DHAWALE, Vaibhav Shrirang; AMARA, Venkateswara Rao; KARPE, Pinakin Arun; MALEK, Vajir; PATEL, Deep; TIKOO, Kulbhushan. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) attenuates allergic airway inflammation in rat asthma model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 306, p. 17–26, 2016. DOI: 10.1016/j.taap.2016.06.026.

DIAMOND, Joshua M. et al. Clinical Risk Factors for Primary Graft Dysfunction after Lung Transplantation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 187, n. 5, p. 527–534, 2013. DOI: 10.1164/rccm.201210-1865OC.

D'IMPÉRIO, Fernando. Morte encefálica, cuidados ao doador de órgãos e transplante de pulmão. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 74–84, 2007. DOI: 10.1590/S0103-507X2007000100010.
DINALLO S; WASEEM M. **Cushing Reflex**. 2022.

DONOGHUE, Mary et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme–Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. **Circulation Research**, [S. l.], v. 87, n. 5, 2000. DOI: 10.1161/01.RES.87.5.e1.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 421–431. DOI: 10.1016/0076-6879(90)86135-I.

DUDEK, Jan. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 5, 2017. DOI: 10.3389/fcell.2017.00090.

EGAN, T. M. et al. Development of the New Lung Allocation System in the United States. **American Journal of Transplantation**, [S. l.], v. 6, n. 5p2, p. 1212–1227, 2006. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01276.x.

EGAN, Thomas M.; HAITHCOCK, Benjamin E.; LOBO, Jason; MODY, Gita; LOVE, Robert B.; REQUARD III, John Jacob; ESPEY, John; ALI, Mir Hasnain. Donation after circulatory death donors in lung transplantation. **Journal of Thoracic Disease**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 6536–6549, 2021. DOI: 10.21037/jtd-2021-13.

EL-HASHIM, Ahmed Z.; RENNO, Waleed M.; RAGHUPATHY, Raj; ABDUO, Heba T.; AKHTAR, Saghir; BENTER, Ibrahim F. Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF-κB-dependent pathways. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 166, n. 6, p. 1964–1976, 2012. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01905.x.

ESSIEN, Eno-Obong; FIORETTI, Kristina; SCALEA, Thomas M.; STEIN, Deborah M. Physiologic Features of Brain Death. **The American Surgeon**, [S. l.], v. 83, n. 8, p. 850–854, 2017. DOI: 10.1177/000313481708300835.

FANG, Y.; GAO, F.; LIU, Z. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates inflammatory response and oxidative stress in hyperoxic lung injury by regulating NF- κ B and Nrf2 pathways. **QJM: An International Journal of Medicine**, [S. l.], v. 112, n. 12, p. 914–924, 2019. DOI: 10.1093/qjmed/hcz206.

FERREIRA, Anderson J. et al. Evidence for Angiotensin-converting Enzyme 2 as a Therapeutic Target for the Prevention of Pulmonary Hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 179, n. 11, p. 1048–1054, 2009. DOI: 10.1164/rccm.200811-1678OC.

FISCHER, Stefan; MACLEAN, Alexandra A.; LIU, Mingyao; KALIRAI, Baljit; KESHAVJEE, Shaf. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by captopril: A novel approach to reduce ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, [S. l.], v. 120, n. 3, p. 573–580, 2000. DOI: 10.1067/mtc.2000.107828.

FISHER, ANDREW J.; DONNELLY, SEAMAS C.; HIRANI, NIKHIL; HASLETT, CHRISTOPHER; STRIETER, ROBERT M.; DARK, JOHN H.; CORRIS, PAUL A. Elevated Levels of Interleukin-8 in Donor Lungs Is Associated with Early Graft Failure after Lung Transplantation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 163, n. 1, p. 259–265, 2001. DOI: 10.1164/ajrccm.163.1.2005093.

FLOERCHINGER, Bernhard; TILNEY, Nicholas L.; TULLIUS, Stefan G. Pathophysiology of Brain Death in Small Animal Models. *Em: The Brain-Dead Organ Donor*. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 55–64. DOI: 10.1007/978-1-4614-4304-9_6.

FOLKESSON, H. G.; MATTHAY, M. A.; HÉBERT, C. A.; BROADDUS, V. C. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 96, n. 1, p. 107–116, 1995. DOI: 10.1172/JCI118009.

GEARA, Abdallah S.; AZZI, Jamil; JUREWICZ, Mollie; ABDI, Reza. The renin-angiotensin system: an old, newly discovered player in immunoregulation. **Transplantation Reviews**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 151–158, 2009. DOI: 10.1016/j.trre.2009.04.002.

GOLDMAN, GIDEON; WELBOURN, RICHARD; KOBZIK, LESTER; VALERI, C. R.; SHEPRO, DAVID; HECHTMAN, HERBERT B. Tumor Necrosis Factor- α Mediates Acid Aspiration-induced Systemic Organ Injury. **Annals of Surgery**, [S. l.], v. 212, n. 4, p. 513–520, 1990. DOI: 10.1097/00000658-199010000-00013.
GROVER, Frederick L. et al. **The Past, Present, and Future of Lung Transplantation**. [s.l.: s.n.].

GUO, Haizhou; NIE, Jun; FAN, Kai; ZHENG, Zhikun; QIAO, Xinwei; LI, Jinsong; WANG, Jianjun; JIANG, Ke. Improvements of surgical techniques in a rat model of an orthotopic single lung transplant. **European Journal of Medical Research**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1, 2013. DOI: 10.1186/2047-783X-18-1.

HAMILTON, B. C. S.; KUKREJA, J.; WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. Protein biomarkers associated with primary graft dysfunction following lung transplantation. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, [S. l.], v. 312, n. 4, p. L531–L541, 2017. DOI: 10.1152/ajplung.00454.2016.

HARDY, JAMES D.; ERASLAN, SADAN; DALTON, MARTIN L.; ALICAN, FIKRI; TURNER, M. Don-. Re-implantation and Homotransplantation of the Lung. **Annals of Surgery**, [S. l.], v. 157, n. 5, p. 707–718, 1963. a. DOI: 10.1097/00000658-196305000-00005.

HARDY, James D.; WEBB, Watts R.; DALTON, Martin L.; WALKER, George R. Lung Homotransplantation in Man. **JAMA**, [S. l.], v. 186, n. 12, 1963. b. DOI: 10.1001/jama.1963.63710120001010.

HARTERT, Marc; SENBAKLAVACI, Ömer; GOHRBANDT, Bernhard; FISCHER, Berthold M.; BUHL, Roland; VAHL, Christian-Friedrich. Lung Transplantation. **Deutsches Ärzteblatt international**, [S. l.], 2014. DOI: 10.3238/arztebl.2014.0107.

INCI, Ilhan. Donors after cardiocirculatory death and lung transplantation. **Journal of Thoracic Disease**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 2660–2669, 2017. DOI: 10.21037/jtd.2017.07.82.

INCI, Ilhan; ZHAI, Wei; ARNI, Stephan; HILLINGER, Sven; VOGT, Peter; WEDER, Walter. N-Acetylcysteine Attenuates Lung Ischemia–Reperfusion Injury After Lung Transplantation. **The Annals of Thoracic Surgery**, [S. l.], v. 84, n. 1, p. 240–246, 2007. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2007.03.082.

ISHLT. **TRENDS IN RECIPIENT CHARACTERISTICS AND IMPACT ON OUTCOMES LUNG TRANSPLANTATION - ADULT RECIPIENTS** . [s.l.: s.n.]. ISKENDER, Ilker et al. Effects of Warm Versus Cold Ischemic Donor Lung Preservation on the Underlying Mechanisms of Injuries During Ischemia and Reperfusion. **Transplantation**, [S. l.], v. 102, n. 5, p. 760–768, 2018. DOI: 10.1097/TP.0000000000002140.

JIMÉNEZ-CASTRO, M. B.; GRACIA-SANCHO, J.; PERALTA, C. Brain death and marginal grafts in liver transplantation. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. e1777–e1777, 2015. DOI: 10.1038/cddis.2015.147.

KALSOTRA, Auinash; ZHAO, Jing; ANAKK, Sayeepriyadarshini; DASH, Pramod K.; STROBEL, Henry W. Brain Trauma Leads to Enhanced Lung Inflammation and Injury: Evidence for Role of P4504Fs in Resolution. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 963–974, 2007. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600396.

KEHOE, K. et al. Dysregulation of the renin-angiotensin system during lung ischemia-reperfusion injury. **Experimental Lung Research**, [S. l.], v. 42, n. 6, p. 277–285, 2016. DOI: 10.1080/01902148.2016.1207725.

KENNEDY, T. P.; JOHNSON, K. J.; KUNKEL, R. G.; WARD, P. A.; KNIGHT, P. R.; FINCH, J. S. Acute acid aspiration lung injury in the rat: biphasic pathogenesis. **Anesthesia and analgesia**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. 87–92, 1989.

KNIGHT, Paul R.; DRUSKOVICH, Gary; TAIT, Alan R.; JOHNSON, Kent J. The Role of Neutrophils, Oxidants, and Proteases in the Pathogenesis of Acid Pulmonary Injury. **Anesthesiology**, [S. l.], v. 77, n. 4, p. 772–778, 1992. DOI: 10.1097/00000542-199210000-00023.

KOLKERT, Joe L. P.; 'T HART, Nils A.; VAN DIJK, Antony; OTTENS, Petra J.; PLOEG, Rutger J.; LEUVENINK, Henri G. D. The gradual onset brain death model: a relevant model to study organ donation and its consequences on the outcome after transplantation. **Laboratory Animals**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 363–371, 2007. DOI: 10.1258/002367707781282848.

KOUTSOUKOU, Antonia. Respiratory mechanics in brain injury: A review. **World Journal of Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 65, 2016. DOI: 10.5492/wjccm.v5.i1.65.

KRAMER, Andreas H.; BAHT, Ryan; DOIG, Christopher J. Time trends in organ donation after neurologic determination of death: a cohort study. **CMAJ Open**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. E19–E27, 2017. DOI: 10.9778/cmajo.20160093.

L.A. DE MARIA, Marilda; D. ARAÚJO, Liliane; A. FRAGA-SILVA, Rodrigo; A.S. PEREIRA, Letícia; J. RIBEIRO, Heder; B. MENEZES, Gustavo; SHENOY, Vinayak; K. RAIZADA, Mohan; J. FERREIRA, Anderson. Anti-hypertensive Effects of Diminazene Aceturate: An Angiotensin- Converting Enzyme 2 Activator in Rats. **Protein & Peptide Letters**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 9–16, 2015. DOI: 10.2174/0929866522666151013130550.

LAMA, Vibha N. et al. Models of Lung Transplant Research: a consensus statement from the National Heart, Lung, and Blood Institute workshop. **JCI Insight**, [S. l.], v. 2, n. 9, 2017. DOI: 10.1172/jci.insight.93121.

LANZA, Katharina; PEREZ, Lucas G.; COSTA, Larissa B.; CORDEIRO, Thiago M.; PALMEIRA, Vitria A.; RIBEIRO, Victor T.; SIMÕES E SILVA, Ana Cristina. Covid-19: the renin–angiotensin system imbalance hypothesis. **Clinical Science**, [S. l.], v. 134, n. 11, p. 1259–1264, 2020. DOI: 10.1042/CS20200492.

LI, Shumin et al. ACE2 Attenuates Epithelial-Mesenchymal Transition in MLE-12 Cells Induced by Silica</p>
</p>
</div>

LIU, Ling; QIU, Hai-Bo; YANG, Yi; WANG, Lian; DING, Hui-Min; LI, Hong-Peng. Losartan, an antagonist of AT1 receptor for angiotensin II, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rat. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 481, n. 1, p. 131–136, 2009. DOI: 10.1016/j.abb.2008.09.019.

LÓPEZ-AGUILAR, Josefina et al. Massive brain injury enhances lung damage in an isolated lung model of ventilator-induced lung injury*. **Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 1077–1083, 2005. DOI: 10.1097/01.CCM.0000162913.72479.F7.

MAGALHÃES, G. S. et al. Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodelling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 172, n. 9, p. 2330–2342, 2015. DOI: 10.1111/bph.13057.

MAGALHAES, Giselle S. et al. Angiotensin-(1–7) Promotes Resolution of Eosinophilic Inflammation in an Experimental Model of Asthma. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00058.

MAGALHÃES, Giselle S.; RODRIGUES-MACHADO, Maria Glória; MOTTA-SANTOS, Daisy; ALENINA, Natalia; BADER, Michael; SANTOS, Robson A.; BARCELOS, Lucíola S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, Maria José. Chronic allergic pulmonary inflammation is aggravated in angiotensin-(1–7) Mas receptor knockout mice. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, [S. l.], v. 311, n. 6, p. L1141–L1148, 2016. DOI: 10.1152/ajplung.00029.2016.

MARIK, Paul E. Aspiration Pneumonitis and Aspiration Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 344, n. 9, p. 665–671, 2001. DOI: 10.1056/NEJM200103013440908.

MARSHALL, V. C. Pathophysiology of brain death: effects on allograft function. **Transplantation Proceedings**, [S. l.], v. 33, n. 1–2, p. 845–846, 2001. DOI: 10.1016/S0041-1345(00)02342-3.

MARTIN, Archer K.; RENEW, J. Ross; JAYARAMAN, Arun L.; MURRAY, Andrew W.; FRITZ, Ashley V.; RAMAKRISHNA, Harish. Analysis of Outcomes in Lung Transplantation. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 1455–1466, 2019. DOI: 10.1053/j.jvca.2018.06.014.

MCCOURTIE, Anton S.; MERRY, Heather E.; FARIVAR, Alexander S.; GOSS, Christopher H.; MULLIGAN, Michael S. Alveolar Macrophage Secretory Products Augment the Response of Rat Pulmonary Artery Endothelial Cells to Hypoxia and Reoxygenation. **The Annals of Thoracic Surgery**, [S. l.], v. 85, n. 3, p. 1056–1060, 2008. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2007.10.058.

MCKEATING, E. G.; ANDREWS, P. J.; MASCIA, L. Leukocyte adhesion molecule profiles and outcome after traumatic brain injury. **Acta neurochirurgica. Supplement**, [S. l.], v. 71, p. 200–2, 1998. DOI: 10.1007/978-3-7091-6475-4_57.

MEERS, Caroline; VAN RAEMDONCK, Dirk; VERLEDEN, Geert M.; COOSEMANS, Willy; DECALUWE, Herbert; DE LEYN, Paul; NAFTEUX, Philippe; LERUT, Toni. The number of lung transplants can be safely doubled using extended criteria donors; A single-center review. **Transplant**

International, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 628–635, 2010. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2009.01033.x.

METHENY, Norma A.; CLOUSE, Ray E.; CHANG, Yie-Hwa; STEWART, Barbara J.; OLIVER, Dana A.; KOLLEF, Marin H. Tracheobronchial aspiration of gastric contents in critically ill tube-fed patients: Frequency, outcomes, and risk factors. **Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 1007–1015, 2006. DOI: 10.1097/01.CCM.0000206106.65220.59.

MEYER, Keith C. Recent advances in lung transplantation. **F1000Research**, [S. l.], v. 7, p. 1684, 2018. DOI: 10.12688/f1000research.15393.1.

MICHEL, S. G. et al. The effects of brain death and ischemia on tolerance induction are organ-specific. **American Journal of Transplantation**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 1262–1269, 2018. DOI: 10.1111/ajt.14674.

MINATO, Takafumi; YAMAGUCHI, Tomokazu; HOSHIZAKI, Midori; NIRASAWA, Satoru; AN, Jianbo; TAKAHASHI, Saori; PENNINGER, Josef M.; IMAI, Yumiko; KUBA, Keiji. ACE2-like enzyme B38-CAP suppresses abdominal sepsis and severe acute lung injury. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 17, n. 7, p. e0270920, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0270920.

MIZUTA, T.; KAWAGUCHI, A.; NAKAHARA, K.; KAWASHIMA, Y. Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. **Transplantation proceedings**, [S. l.], v. 21, n. 1 Pt 3, p. 2601–2, 1989.

MORRISON, Morvern Isabel; PITHER, Thomas Leonard; FISHER, Andrew John. Pathophysiology and classification of primary graft dysfunction after lung transplantation. **Journal of Thoracic Disease**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 4084–4097, 2017. DOI: 10.21037/jtd.2017.09.09.

MORRISSEY, Paul E.; MONACO, Anthony P. Donation After Circulatory Death. **Transplantation**, [S. l.], v. 97, n. 3, p. 258–264, 2014. DOI: 10.1097/01.TP.0000437178.48174.db.

NADER-DJALAL, Nader; KNIGHT, Paul R.; THUSU, Kuldip; DAVIDSON, Bruce A.; HOLM, Bruce A.; JOHNSON, Kent J.; DANDONA, Parish. Reactive Oxygen Species Contribute to Oxygen-Related Lung Injury After Acid Aspiration. **Anesthesia & Analgesia**, [S. l.], v. 87, n. 1, p. 127–133, 1998. DOI: 10.1097/00000539-199807000-00028.

NAKAGAWA, Kazuma; TANG, Julin F. Physiologic response of human brain death and the use of vasopressin for successful organ transplantation. **Journal of Clinical Anesthesia**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 145–148, 2011. DOI: 10.1016/j.jclinane.2009.12.015.

NAKAJIMA, Daisuke et al. Lung Lavage and Surfactant Replacement During Ex Vivo Lung Perfusion for Treatment of Gastric Acid Aspiration–Induced Donor Lung Injury. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 577–585, 2017. DOI: 10.1016/j.healun.2016.11.010.

NATAATMADJA, Maria; PASSMORE, Margaret; RUSSELL, Fraser D.; PRABOWO, Sulistiana; CORLEY, Amanda; FRASER, John F. Angiotensin Receptors as Sensitive Markers of Acute Bronchiole Injury After Lung Transplantation. **Lung**, [S. l.], v. 192, n. 4, p. 563–569, 2014. DOI: 10.1007/s00408-014-9588-3.

NATHAN, Steven D. The Future of Lung Transplantation. **Chest**, [S. l.], v. 147, n. 2, p. 309–316, 2015. DOI: 10.1378/chest.14-1748.

NEPOMUCENO, Natalia Aparecida; MOREIRA RUIZ, Liliane; OLIVEIRA-MELO, Paolo; IKEOKA EROLES, Náthaly Christinie; GOMES VIANA, Isabela; PÊGO-FERNANDES, Paulo Manuel; DE OLIVEIRA BRAGA, Karina Andrighetti. Study of Experimental Organ Donation Models for Lung Transplantation. **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], n. 205, 2024. DOI: 10.3791/62975.

NODA, Kentaro; PHILIPS, Brian J.; ATALE, Neha; SANCHEZ, Pablo G. Endothelial protection in lung grafts through heparanase inhibition during ex vivo lung perfusion in rats. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, [S. l.], v. 42, n. 6, p. 697–706, 2023. DOI: 10.1016/j.healun.2023.03.010.

OHSUMI, Akihiro et al. Sevoflurane Attenuates Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Lung Transplantation Model. **The Annals of Thoracic Surgery**, [S. l.], v. 103, n. 5, p. 1578–1586, 2017. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2016.10.062.

OHSUMI, Akihiro et al. A method for translational rat ex vivo lung perfusion experimentation. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, [S. l.], v. 319, n. 1, p. L61–L70, 2020. DOI: 10.1152/ajplung.00256.2019.

OTT, LINDA; MCCLAIN, CRAIG J.; GILLESPIE, MARK; YOUNG, BYRON. Cytokines and Metabolic Dysfunction After Severe Head Injury. **Journal of Neurotrauma**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 447–472, 1994. DOI: 10.1089/neu.1994.11.447.

PANCHABHAI, Tanmay S.; CHADDHA, Udit; MCCURRY, Kenneth R.; BREMNER, Ross M.; MEHTA, Atul C. Historical perspectives of lung transplantation: connecting the dots. **Journal of Thoracic Disease**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 4516–4531, 2018. DOI: 10.21037/jtd.2018.07.06.

PÊGO-FERNANDES, P. M. et al. Recommendations for the Use of Extended Criteria Donors in Lung Transplantation. **Transplantation Proceedings**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 216–219, 2011. DOI: 10.1016/j.transproceed.2010.12.050.

PERIS, Adriano; LAZZERI, Chiara; D'ANTONIO, Lorenzo; BOMBARDI, Marco; BONIZZOLI, Manuela; GUETTI, Cristiana; MACCHERINI, Massimo; MIGLIACCIO, Maria Luisa. Epidemiological changes in potential heart donors after brain death: a retrospective 15 year cohort study. **Internal and Emergency Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 371–375, 2019. DOI: 10.1007/s11739-018-1897-8.

PIANTADOSI, Claude A.; SULIMAN, Hagir B. Redox regulation of mitochondrial biogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 53, n. 11, p. 2043–2053, 2012. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.014.

POKHAREL, Marissa D.; GARCIA-FLORES, Alejandro; MARCIANO, David; FRANCO, Maria C.; FINEMAN, Jeffrey R.; AGGARWAL, Saurabh; WANG, Ting; BLACK, Stephen M. Mitochondrial network dynamics in pulmonary disease: Bridging the gap between inflammation, oxidative stress, and bioenergetics. **Redox Biology**, [S. l.], v. 70, p. 103049, 2024. DOI: 10.1016/j.redox.2024.103049.

POMPER, G. et al. Introducing a mouse model of brain death. **Journal of Neuroscience Methods**, [S. l.], v. 192, n. 1, p. 70–74, 2010. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2010.07.019.

PORTEOUS, Mary K.; LEE, James C. Primary Graft Dysfunction After Lung Transplantation. **Clinics in Chest Medicine**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 641–654, 2017. DOI: 10.1016/j.ccm.2017.07.005.

PRATSCHKE, J.; NEUHAUS, P.; TULLIUS, S. G. What can be learned from brain-death models? **Transplant International**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 15–21, 2005. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2004.00018.x.

PUIG, F. et al. A new experimental model of acid- and endotoxin-induced acute lung injury in rats. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, [S. l.], v. 311, n. 2, p. L229–L237, 2016. DOI: 10.1152/ajplung.00390.2015.

PUNCH, J. D.; HAYES, D. H.; LAPORTE, F. B.; MCBRIDE, V.; SEELY, M. S. Organ Donation and Utilization in the United States, 1996–2005. **American Journal of Transplantation**, [S. l.], v. 7, p. 1327–1338, 2007. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2007.01779.x.

QARADAKHI, Tawar et al. The potential actions of angiotensin-converting enzyme II (ACE2) activator diminazene aceturate (DIZE) in various diseases. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [S. l.], v. 47, n. 5, p. 751–758, 2020. DOI: 10.1111/1440-1681.13251.

RAGHAVENDRAN, Krishnan; NEMZEK, Jean; NAPOLITANO, Lena M.; KNIGHT, Paul R. Aspiration-induced lung injury. **Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 818–826, 2011. DOI: 10.1097/CCM.0b013e31820a856b.

REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES. **Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2024)**.

REISS, Lucy Kathleen; UHLIG, Ulrike; UHLIG, Stefan. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. **European Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 91, n. 6–7, p. 590–601, 2012. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.11.004.

ROKS, Anton J. M.; VAN GEEL, Peter Paul; PINTO, Yigal M.; BUIKEMA, Hendrik; HENNING, Robert H.; DE ZEEUW, Dick; VAN GILST, Wiek H. Angiotensin-(1–7) Is a Modulator of the Human Renin-Angiotensin System. **Hypertension**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 296–301, 1999. DOI: 10.1161/01.HYP.34.2.296.

SAITO, Masao; CHEN-YOSHIKAWA, Toyofumi F.; TAKAHASHI, Mamoru; KAYAWAKE, Hidenao; YOKOYAMA, Yuhei; KUROKAWA, Ryosuke; HIRANO, Shin-ichi; DATE, Hiroshi. Protective effects of a hydrogen-rich solution during cold ischemia in rat lung transplantation. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, [S. l.], v. 159, n. 5, p. 2110–2118, 2020. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2019.09.175.

SANA VILELA, Vanessa et al. Anti-inflammatory effect of thalidomide in an experimental lung donor model of brain death. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 8796, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-59267-1.

SANTANA RODRÍGUEZ, Norberto et al. Modificaciones técnicas del modelo de trasplante pulmonar ortotópico en ratas con donantes en muerte cerebral. **Archivos de Bronconeumología**, [S. l.], v. 47, n. 10, p. 488–494, 2011. DOI: 10.1016/j.arbres.2011.05.003.

SANTOS, Robson Augusto Souza; SAMPAIO, Walkyria Oliveira; ALZAMORA, Andreia C.; MOTTA-SANTOS, Daisy; ALENINA, Natalia; BADER, Michael; CAMPAGNOLE-SANTOS, Maria Jose. The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 98, n. 1, p. 505–553, 2018. DOI: 10.1152/physrev.00023.2016.

SCHLEIFENBAUM, Johanna. Alamandine and Its Receptor MrgD Pair Up to Join the Protective Arm of the Renin-Angiotensin System. **Frontiers in Medicine**, [S. l.], v. 6, 2019. DOI: 10.3389/fmed.2019.00107.

SCHOSSLEITNER, Klaudia et al. A Peptide to Reduce Pulmonary Edema in a Rat Model of Lung Transplantation. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. e0142115, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0142115.

SEIFI, Ali; LACCI, John Vincent; GODOY, Daniel Agustin. Incidence of brain death in the United States. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, [S. l.], v. 195, p. 105885, 2020. DOI: 10.1016/j.clineuro.2020.105885.

SETZER, Florian; SCHMIDT, Barbara; HUETER, Lars; SCHWARZKOPF, Konrad; SÄNGER, Jörg; SCHREIBER, Torsten. Characterization of the seven-day course of pulmonary response following unilateral lung acid injury in rats. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. e0198440, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0198440.

SHAH, Rupal; DIAMOND, Joshua. Primary Graft Dysfunction (PGD) Following Lung Transplantation. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 39, n. 02, p. 148–154, 2018. DOI: 10.1055/s-0037-1615797.

SHANLEY, Thomas P.; DAVIDSON, Bruce A.; NADER, Nader D.; BLESS, Nicholas; VASI, Neeti; WARD, Peter A.; JOHNSON, Kent J.; KNIGHT, Paul R. Role of macrophage inflammatory protein-2 in aspiration-induced lung injury. **Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 28, n. 7, p. 2437–2444, 2000. DOI: 10.1097/00003246-200007000-00041.

SHARMA, Ashish K.; FERNANDEZ, Lucas G.; AWAD, Alaa S.; KRON, Irving L.; LAUBACH, Victor E. Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF- α during pulmonary ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, [S. l.], v. 293, n. 1, p. L105–L113, 2007. DOI: 10.1152/ajplung.00470.2006.

SHENG, Min; LI, Qinke; HUANG, Wenhan; YU, Dan; PAN, Hang; QIAN, Kechen; REN, Feifeng; LUO, Lei; TANG, Lin. Ang-(1–7)/Mas axis ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via restoration of Nox4-Nrf2 redox homeostasis. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 962, p. 176233, 2024. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.176233.

SHENOY, Vinayak et al. The Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiogenesis-(1–7)/Mas Axis Confers Cardiopulmonary Protection against Lung Fibrosis and Pulmonary Hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 182, n. 8, p. 1065–1072, 2010. DOI: 10.1164/rccm.200912-1840OC.

SHENOY, Vinayak et al. Diminazene Attenuates Pulmonary Hypertension and Improves Angiogenic Progenitor Cell Functions in Experimental Models. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 187, n. 6, p. 648–657, 2013. DOI: 10.1164/rccm.201205-0880OC.

SHOJA, Mohammadali M.; TUBBS, R. Shane; ARDALAN, Mohammad R.; LOUKAS, Marios; PHAGAVA, Helen; COHEN-GADOL, Aaron A. A testimony to the history of heart and lung transplantation: English translation of Demikhov's paper, "Transplantation of the Heart, Lungs and other Organs". **International Journal of Cardiology**, [S. l.], v. 143, n. 3, p. 230–234, 2010. DOI: 10.1016/j.ijcard.2010.02.078.

SIM CHOI, Hyung; WOO KIM, Jun; CHA, Young-Nam; KIM, Chaekyun. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 31–44, 2006. DOI: 10.1080/15321810500403722.

SIMAS, Rafael; LUIZ ZANONI, Fernando; DOS SANTOS COUTINHO E SILVA, Raphael; FELIPE PINHO MOREIRA, Luiz. Brain death effects on lung microvasculature in an experimental model of lung donor. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. e20180299–e20180299, 2020. DOI: 10.36416/1806-3756/e20180299.

SIMÕES E SILVA, AC; SILVEIRA, KD; FERREIRA, AJ; TEIXEIRA, MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 169, n. 3, p. 477–492, 2013. DOI: 10.1111/bph.12159.

SKRABAL, Christian A.; THOMPSON, Larry O.; POTAPOV, Evgenji V.; SOUTHARD, Robert E.; JOYCE, David L.; YOUKER, Keith A.; NOON, George P.; LOEBE, Matthias. Organ-specific regulation of pro-inflammatory molecules in heart, lung, and kidney following brain death. **Journal of Surgical Research**, [S. l.], v. 123, n. 1, p. 118–125, 2005. DOI: 10.1016/j.jss.2004.07.245.

SMITH, Martin. Physiologic changes during brain stem death—lessons for management of the organ donor. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, [S. l.], v. 23, n. 9, p. S217–S222, 2004. DOI: 10.1016/j.healun.2004.06.017.

SNELL, Gregory I. et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction, part I: Definition and grading—A 2016 Consensus Group statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 1097–1103, 2017. DOI: 10.1016/j.healun.2017.07.021.

STONE, Matthew L.; SHARMA, Ashish K.; ZHAO, Yunge; CHARLES, Eric J.; HUERTER, Mary E.; JOHNSTON, William F.; KRON, Irving L.; LYNCH, Kevin R.; LAUBACH, Victor E. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonism attenuates lung ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, [S. l.], v. 308, n. 12, p. L1245–L1252, 2015. DOI: 10.1152/ajplung.00302.2014.

SUCCI, José Ernesto; FORTE, Vicente; PERFEITO, João Alessio B. T.; BEPPU, Osvaldo S.; MARTINEZ, José Antônio B.; BUFFOLO, Ênio; LEÃO, Luiz Eduardo V.; SANTOS, Manuel Lopes. Transplante isolado de pulmão: experiência da Escola Paulista de Medicina. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 137–146, 1991. DOI: 10.1590/S0102-76381991000300001.

TIAN, Dong; SHIYA, Haruhiko; SATO, Masaaki; NAKAJIMA, Jun. Rat lung transplantation model: modifications of the cuff technique. **Annals of Translational Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 407–407, 2020. DOI: 10.21037/atm.2020.02.46.

TORONTO LUNG TRANSPLANT GROUP. Unilateral Lung Transplantation for Pulmonary Fibrosis. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 314, n. 18, p. 1140–1145, 1986. DOI: 10.1056/NEJM198605013141802.

UNIVERSITY HEALTH NETWORK. **UHN's 3,000th lung transplant**. 2023.

VALLE MARTINS, Ana Luiza et al. Increased circulating levels of angiotensin-(1–7) in severely ill COVID-19 patients. **ERJ Open Research**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 00114–02021, 2021. DOI: 10.1183/23120541.00114-2021.

VAN ZANDEN, Judith E. et al. Rat donor lung quality deteriorates more after fast than slow brain death induction. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. e0242827, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0242827.

VELKOSKA, Elena; PATEL, Sheila K.; BURRELL, Louise M. Angiotensin converting enzyme 2 and diminazene. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, [S. l.], v. 25, n. 5, p. 384–395, 2016. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000254.

VENUTA, Federico; VAN RAEMDONCK, Dirk. History of lung transplantation. **Journal of Thoracic Disease**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 5458–5471, 2017. DOI: 10.21037/jtd.2017.11.84.

WANG, Li-Fang et al. Diminazen Aceturate Protects Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury via Inhibition of ADAM17-Mediated Angiotensin-Converting Enzyme 2 Shedding. **Frontiers in pharmacology**, [S. l.], v. 12, p. 713632, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.713632.

WAUTERS, Shana; SOMERS, Jana; DE VLEESCHAUWER, Stephanie; VERBEKEN, Erik; VERLEDEN, Geert M.; VAN LOON, Johannes; VAN RAEMDONCK, Dirk E. M. Evaluating lung injury at increasing time intervals in a murine brain death model. **Journal of Surgical Research**, [S. l.], v. 183, n. 1, p. 419–426, 2013. DOI: 10.1016/j.jss.2013.01.011.

WEILL, David et al. A consensus document for the selection of lung transplant candidates: 2014—An update from the Pulmonary Transplantation Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 1–15, 2015. DOI: 10.1016/j.healun.2014.06.014.

WIJDICKS, E. F. M.; VARELAS, P. N.; GRONSETH, G. S.; GREER, D. M. Evidence-based guideline update: Determining brain death in adults: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, [S. l.], v. 74, n. 23, p. 1911–1918, 2010. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181e242a8.

WOJCIAK-STOTHARD, Beata; TSANG, Lillian Yen Fen; HAWORTH, Sheila G. Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, [S. l.], v. 288, n. 4, p. L749–L760, 2005. DOI: 10.1152/ajplung.00361.2004.

WU, Shan; FANG, Cindy X.; KIM, Jihye; REN, Jun. Enhanced pulmonary inflammation following experimental intracerebral hemorrhage. **Experimental Neurology**, [S. l.], v. 200, n. 1, p. 245–249, 2006. DOI: 10.1016/j.expneurol.2006.01.027.

YAMAMOTO, Masayuki; KENSLER, Thomas W.; MOTOHASHI, Hozumi. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining

Redox Homeostasis. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 98, n. 3, p. 1169–1203, 2018. DOI: 10.1152/physrev.00023.2017.

YAMAZATO, Yoriko et al. Prevention of Pulmonary Hypertension by Angiotensin-Converting Enzyme 2 Gene Transfer. **Hypertension**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 365–371, 2009. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.125468.

YOUN, Teddy S.; GREER, David M. Brain Death and Management of a Potential Organ Donor in the Intensive Care Unit. **Critical Care Clinics**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 813–831, 2014. DOI: 10.1016/j.ccc.2014.06.010.

YOUSUFUDDIN, Mohammed; YAMANI, Mohamad H. The renin–angiotensin hypothesis for the pathogenesis of cardiac allograft vasculopathy. **International Journal of Cardiology**, [S. l.], v. 95, n. 2–3, p. 123–127, 2004. DOI: 10.1016/j.ijcard.2003.05.027.

YUSEN, Roger D. et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Lung and Heart–Lung Transplant Report—2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, [S. l.], v. 35, n. 10, p. 1170–1184, 2016. DOI: 10.1016/j.healun.2016.09.001.

ZAMBELLI, Vanessa et al. Angiotensin-(1-7) improves oxygenation, while reducing cellular infiltrate and fibrosis in experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. **Intensive Care Medicine Experimental**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 8, 2015. DOI: 10.1186/s40635-015-0044-3.

ZHAI, Wei; GE, Jing; INCI, Ilhan; HILLINGER, Sven; MARKUS, Cardell; KOROM, Stephan; WEDER, Walter. Simplified Rat Lung Transplantation by Using a Modified Cuff Technique. **Journal of Investigative Surgery**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 33–37, 2008. DOI: 10.1080/08941930701834114.

ZHANG, Xiaoqing; LI, Shuren; NIU, Shaoqian. ACE2 and COVID-19 and the resulting ARDS. **Postgraduate Medical Journal**, [S. l.], v. 96, n. 1137, p. 403–407, 2020. DOI: 10.1136/postgradmedj-2020-137935.

ZHAO, Yakun; ZHU, Qingguo; SUN, Shiping; QIU, Yu; LI, Jingquan; LIU, Wei; YUAN, Gangjun; MA, Hua. Renal transplantation increases angiotensin II receptor-mediated vascular contractility associated with changes of epigenetic mechanisms. **International Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], 2018. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3435.

ZHENG, J. et al. Activation of the ACE2/Ang-(1–7)/Mas pathway reduces oxygen–glucose deprivation-induced tissue swelling, ROS production, and cell death in mouse brain with angiotensin II overproduction. **Neuroscience**, [S. l.], v. 273, p. 39–51, 2014. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.060.

APÊNDICE 1



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**ATIVAÇÃO DA ECA2 NA PREVENÇÃO DA LESÃO PULMONAR AGUDA EM MODELO EXPERIMENTAL DE TRANSPLANTE PULMONAR**” registrada com o nº **1532/2020**, sob a responsabilidade de **Paulo Manuel Pêgo Fernandes e Paolo Oliveira Melo**, apresentada pela Comissão Científica do InCor - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 11/11/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 20-01-2021 Término: 20-01-2025
Espécie/linhagem/raça	Rato isogênico Lewis
Nº de animais	72
Peso/Idade	machos
Sexo	9-10 semanas
Origem	Biotério da Universidade de Campinas (UNICAMP)

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 11 de novembro de 2020

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

APÊNDICE 2



University Health Network
Toronto General Hospital Toronto Western Hospital Princess Margaret Hospital
Animal Care Committee

July 24, 2023

Dr. Marcelo Cypel

Dear Dr. Cypel,

Re: AUP # - 6858.0 - ACE2 activation in the treatment of acute lung injury during normothermic ex vivo lung perfusion

The University Health Network, Animal Care Committee has provisionally approved your Animal Use Protocol application.

- The category of invasiveness has been revised to D.
- Please confirm if the grant details provided is still valid
- On your next submission in the Protocol Rationale section, please include procedures and provide concise response in non-technical terms that are appropriate as a public relations statement. It would help your peers and Community Representatives on the ACC to better understand your protocol.
- AUP to be updated with dosing details for MasR and DIZE. Are there any data from prior studies using these two antagonist that can be included.
- Please contact ARC clinical vet at arcvet@uhnresearch.ca when during the initial HCL titration process.

Date of Approval: July 20th, 2023

Please note the **AUP # 6858.0** must be quoted when placing animal orders with the Animal Resources Centre. Animal ordered under this protocol must only be used for this approved project and please note that commencement of work within the vivarium is contingent upon the availability of space.

This protocol will expire 2023-10-24.

Sincerely,

Dr. Jeremy Sivak, PhD
 Chairperson, Animal Care Committee
 University Health Network, TMDT/TGH/TWH

Please note: All Animal Care related correspondences should be addressed to: ARC, c/o Lih Ling Chung, 6th Floor, MaRS – Toronto Medical Discovery Tower, 101 College Street, Toronto, ON., M5G 1L7.