

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
FACULDADE DE MEDICINA - FAMED
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS

**O EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA (NAC) SOBRE A LESÃO DE ISQUEMIA E
REPERFUSÃO PULMONAR EM RATOS**

LUIZ FELIPE FORGIARINI

Porto Alegre

2013

LUIZ FELIPE FORGIARINI

**O EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA (NAC) SOBRE A LESÃO DE ISQUEMIA E
REPERFUSÃO PULMONAR EM RATOS**

*Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em
Ciências Pneumológicas, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul - UFRGS*

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Feijó Andrade

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Forgiarini, Luiz Felipe

O efeito da N-acetilcisteína (NAC) sobre a lesão de isquemia e reperfusão pulmonar em ratos / Luiz Felipe Forgiarini. -- 2013.

86 f.

Orientador: Cristiano Feijó Andrade.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Isquemia e reperfusão pulmonar. 2. N-acetilcisteína. 3. Inflamação. 4. Estresse Oxidativo.
I. Andrade, Cristiano Feijó, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Marisete Forgiarini e Luiz Alberto Forgiarini. Agradeço a cada dia por estar com vocês ao meu lado, me fortalecendo e me ensinando os caminhos que norteiam um homem de bem. Amo vocês a cada dia mais!

A minha avó, Ondina Gross Brehm, uma pessoa com um coração enorme! “Minha véia” que sempre esteve do meu lado e me deu um amor incondicional. Mesmo que você não esteja ao meu lado agora, eu quero dividir mais esta alegria! Te amo para sempre!

Ao meu avô, José Osvaldo Brehm, um homem de exemplo em caráter e humildade. Tenha certeza que o senhor me deixou muitos ensinamentos e muito amor.

Ao meu irmão, Luiz Alberto Forgiarini Junior, pelo seu apoio e dedicação em todos os momentos. Acredito que você sempre foi uma peça fundamental para o meu aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marisete Forgiarini e Luiz Alberto Forgiarini, pelo amor incondicional e por estarem sempre junto a mim em todos os momentos e conquistas da minha vida.

Ao meu irmão, Luiz Alberto Forgiarini Junior, pelo seu companheirismo e conselhos, tanto em minha vida como na carreira científica. Tenho certeza de que você é um grande profissional e um grande amigo.

Ao Dr. Cristiano Feijó Andrade, meu orientador, uma pessoa de grande talento. Provando a cada momento que podemos conquistar os nossos sonhos através da nossa vontade. Agradeço todos os conselhos e “puxões de orelha” durante a minha formação acadêmica. Obrigado por ter me dado o prazer de ser seu orientando.

A Dra. Norma Possa Marroni, pela oportunidade concedida no primeiro mês de minha graduação, a senhora ajudou a tornar este sonho possível. Sua trajetória é um exemplo a ser seguido. Obrigado por todo ensinamento e carinho, pois serei eternamente grato a tudo que me ensinou.

A minha querida amiga e colega de laboratório, Mariel Barbachan e Silva, que sempre me aguentou nos dias difíceis e foi de fundamental importância para a execução das técnicas deste trabalho.

Ao meu grande amigo e colega Darlan Pase da Rosa, por estar sempre comigo em qualquer momento. Sua colaboração e dedicação me ajudaram muito. Até mesmo as suas piadas sem graça!

Ao meu grande amigo Néelson Alexandre Kretzmann Filho, que desde o início da minha carreira está ao meu lado. Tudo que você me ensinou foi possível de executar neste trabalho.

A minha amiga e colega de laboratório, Renata Sallati Ferrari, seja nos momentos de discussão científica ou de descontração no trabalho você fez parte disso tudo!

Aos alunos e futuros cirurgiões: Rodrigo Mariano, Artur de Oliveira Paludo e Leonardo Rocha pela dedicação e disponibilidade para realização das fases experimentais do projeto.

A todos os funcionários do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, os quais auxiliaram no desenvolvimento do trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas neste processo. Adaptado de Ferreira e cols. (Ferreira et al., 1997).

Figura 2. Geração das ERO a partir da ação da xantina-oxidase sobre a hipoxantina em condições de isquemia e reperfusão. Adaptada de Pinheiro e colaboradores (Pinheiro et al., 1999).

Figura 3. Reações químicas responsáveis pela formação das espécies reativas de do oxigênio. SOD: superóxido dismutase, Fe^{++} : íon ferroso, Fe^{+++} : íon férrico.

Figura 4. Formação de espécies reativas do oxigênio durante a isquemia-reperfusão e a anóxia-reoxigenação no pulmão. Modificado de de Perrot e colaboradores (de Perrot et al., 2003).

Figura 5. Peroxidação lipídica da membrana celular iniciada pelo radical hidroxila.

Figura 6. Estrutura molecular da N-acetilcisteína (NAC). Fonte: Tepel 2007.

Figura 7. Produção de ERO pelos leucócitos. MPO- mieloperoxidase.

Figura 8. Ativação do Fator de transcrição nuclear kappa B. Fonte: Souza et al. 2010.

Figura 9. Os macrófagos do doador são ativados pela isquemia e liberam citocinas inflamatórias durante a fase precoce, as quais ativam os neutrófilos e linfócitos T do receptor que irão iniciar a fase tardia da lesão de isquemia-reperfusão. Modificado de de Perrot et al. (de Perrot et al., 2003)

LISTA DE FIGURAS – ARTIGO

Figure 1. Pulmonary lipid peroxidation using TBARS assay were demonstrates a significant increase in IR and NAC-Pre groups (* $p < 0.01$) when compared to SHAM group. NAC-Post Group showed lower increase in lipid peroxidation when compared the IR group ([#] $p < 0.05$). SOD activity did show any difference among the groups.....**56**

Figure 2. The expression of phosphorylated p65 and I κ B in lung tissues. An overexpression of p65 and I κ B were found in the IR and NAC-Pre groups (* $p < 0.001$) when compared to SHAM group. NAC-Pre and NAC-Post groups showed a lower expression when compared to IR group ([#] $p < 0.01$).....**57**

Figure 3. Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α), Interleukin-1 Beta (IL-1 β) and Cleaved Caspase 3 expression in lung tissues. The IR and NAC-Pre groups exhibited increased expression when compared to SHAM and NAC-Post groups (* $p < 0.01$). NAC-Pre and NAC-Post groups presented a significantly reduced expression after reperfusion ([#] $p < 0.01$) when compared the IR group.....**58**

Figure 4. The effects of NAC and IR on iNOS and Nitrotyrosine expression. iNOS expression demonstrated a significant increase in the IR and both NAC groups ($p < 0.001$) when compared to the SHAM group. There was a significant increase in the Nitrotyrosine expression after reperfusion in the IR and NAC-Pre groups ($p < 0.001$) when compared with SHAM and NAC-Post groups. NAC-Pre group

demonstrates a significant decreased ($^{\#}p<0.01$) when compared to the IR group.....**59**

Figure 5. Histopathological analysis showed cellular infiltrates, thickening of the alveolar septae and atelectasis in the IR group. The NAC-Post group showed less evident histological features than IR group. A – SHAM group; B – IR group; C – NAC-Pre group; D – NAC-Pre group.....**60**

LISTA DE TABELAS – ARTIGO

Table 1. The effects of ischemia on the mean arterial pressure and blood gas analyses. There were no significant difference among the groups. NS – non significant.....**55**

ABREVIATURAS

ADP - Difosfato de Adenosina

AMP - Monofosfato de Adenosina

ATP - Trifosfato de Adenosina

CAT – Catalase

CO₂ - Gás Carbônico

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EAO – Espécies Ativas de Oxigênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GPx – Glutathione Peroxidase

GSH - Glutathione

H₂O – Água

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular

I κB – Inibidor kappa B

IKK – Quinases IκB

IL-1 – Interleucina 1

IL-8 – Interleucina 8

INF-γ – Interferon gamma

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível

IR – Isquemia-reperfusão

K⁺ - Potássio

MPO – Mieloperoxidase

Na⁺ - Sódio

NAC – N-acetilcisteína

NADP – Dinucleotídeo Fosfato de Nicotinamida

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NF- κ B - Fator de Transcrição Nuclear kappa beta

NO – Óxido Nítrico

O₂ - Oxigênio

O₂⁻ - Radical Superóxido

O₂⁻ - Superóxido

OH⁻ - Radical Hidroxila

PaCO₂ – Pressão Parcial de Gás Carbônico no sangue arterial

PAF – Fator de ativação plaquetário

PAM – Pressão Arterial Média

PaO₂ – Pressão Parcial de Oxigênio no sangue arterial

PGE₁ - Prostaglandinas

PGI₂ - Prostaciclina

RLO – Radicais livres de Oxigênio

SOD – Superóxido Dismutase

TAK1 – Fator de crescimento transformante- β -quinase ativada 1

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sumário

FICHA CATALOGRÁFICA	III
DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE FIGURAS – ARTIGO	VIII
LISTA DE TABELAS – ARTIGO	IX
ABREVIATURAS	X
SUMÁRIO.....	XII
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REFERENCIAL TEÓRICO	8
2.1 DISFUNÇÃO PRIMÁRIA DO ENXERTO	8
2.2 LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO	9
2.3. RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	13
2.3.1. <i>Estresse oxidativo e lesão de isquemia-reperfusão</i>	15
2.3.2. <i>Estresse oxidativo e lesão de isquemia-reperfusão pulmonar</i>	18
2.3.3. <i>Peroxidação lipídica</i>	21
2.3.4. <i>Sistema de defesa antioxidante</i>	22
2.3.5. <i>N- acetilcisteína (NAC)</i>	24
2.4. CÁLCIO E BOMBA DE SÓDIO NA LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO	25
2.5. ENDOTÉLIO	26
2.6. FERRO.....	27
2.7 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	27
2.7.1. <i>Fator de Transcrição Nuclear kappa B</i>	29
2.7.2 <i>Óxido Nítrico</i>	32
2.7.3. <i>Ativação leucocitária</i>	33
2.8. APOPTOSE E LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO PULMONAR.....	35
2.8.1. <i>Caspases</i>	36
3. JUSTIFICATIVA.....	38
4. OBJETIVOS	39
4.1 OBJETIVO GERAL	39
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5. ARTIGO CIENTÍFICO – REVISTA MEDIATORS OF INFLAMMATION	40
6. CONCLUSÕES	64
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

RESUMO

Objetivo – Verificar os efeitos da N-acetilcisteína (NAC), administrada antes e após isquemia em um modelo animal da lesão pulmonar de isquemia-reperfusão.

Métodos - Vinte e quatro ratos Wistar foram submetidos a um modelo experimental de clampeamento do hilo pulmonar esquerdo durante 45 minutos, seguido por 2 horas de reperfusão. Os animais foram divididos em quatro grupos: SHAM, isquemia-reperfusão (IR), N-acetilcisteína pré isquemia (NAC-Pré) e NAC pós isquemia (NAC-Pós). Foram avaliados os parâmetros hemodinâmicos, gasométricos e histológicos. Foram analisadas a expressão protéica de iNOS, nitrotirosina, caspase 3 clivada e NF- κ B (sub-unidade p65 fosforilada), I κ B- α , TNF- α e expressão de IL-1 β . A peroxidação lipídica foi avaliada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD). A infiltração de neutrófilos foi determinada por atividade de mieloperoxidase.

Resultados - Não houve diferenças significativas nos parâmetros hemodinâmicos e gasométricos entre os grupos. Houve um aumento significativo na peroxidação lipídica nos grupos IR e NAC-Pré ($p < 0,01$) quando comparado com SHAM e NAC-Pós. Não houve diferença na SOD entre os grupos. As expressões de NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , nitrotirosina e caspase 3 clivada estavam significativamente aumentadas no grupo IR quando comparado ao SHAM e grupos NAC ($p < 0,01$). O grupo NAC-Pré mostrou um aumento significativo na expressão dessas proteínas quando comparado com SHAM e NAC-Pós ($p < 0,01$). A expressão de iNOS encontrava-se elevada em todos os grupos quando comparados ao SHAM ($p < 0,01$).

Conclusão - O uso intravenoso da NAC protege o pulmão contra a lesão de isquemia e reperfusão pulmonar. O seu uso reduz o dano provocado pelo estresse oxidativo, além disso esta substância apresenta propriedades anti-inflamatórias e previne a apoptose. Quando utilizada logo após o final do período de isquemia, a NAC potencializa seus efeitos protetores mostrando-se este como o melhor período para sua administração.

ABSTRACT

Objective - To verify the effects of N-acetylcysteine (NAC) administered before and after ischemia in an animal model of lung ischemia-reperfusion injury.

Methods – Twenty-four Wistar rats were subjected to an experimental model of selective left pulmonary hilum clamping for 45 minutes followed by 2 hours of reperfusion. The animals were divided into four groups: SHAM, ischemia-reperfusion (IR), N-acetylcysteine pre ischemia (NAC-Pre) and NAC post ischemia (NAC-Post) groups. We recorded the hemodynamic parameters, blood gas analysis and histology. We measured the iNOS, nitrotyrosine, cleaved caspase 3, NF- κ B (sub-unit phospho p65), I κ B- α , TNF- α and IL-1 β expression. Lipid peroxidation was assessed by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay and the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD). Neutrophil infiltration was assayed by myeloperoxidase activity.

Results - No significant differences were observed in hemodynamic parameters and blood gas analysis among the groups. Lipid peroxidation was significantly higher in IR and NAC-Pre groups ($p < 0.01$). SOD activity had no difference among the groups. The expressions of NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , Nitrotyrosine and Cleaved caspase 3 were significantly higher in the IR group when compared to SHAM and NAC groups ($p < 0.01$). NAC-Pre group showed a significant higher expression of these proteins when compared to SHAM and NAC-Post groups ($p < 0.01$). After reperfusion the expression of iNOS increased almost uniformly in all groups when compared to SHAM group ($p < 0.01$).

Conclusion - The intravenous administration of NAC demonstrated protective properties against lung IR injury. Its use reduces the damage produced by oxidative stress, has anti-inflammatory activity and prevents apoptosis. Furthermore, the use of NAC just after reperfusion potentiates its protective effects showing to be the more effective period for its administration.

1. Introdução

O transplante pulmonar é o tratamento de escolha para pacientes com doenças pulmonares em fase terminal. Porém, o sucesso imediato do transplante pulmonar está diretamente relacionado à incidência de disfunção precoce do enxerto ocasionada pela chamada lesão de isquemia e reperfusão, responsável por até 20% de mortalidade no período pós-operatório precoce (Cooper et al., 1994, King et al., 2000).

O sucesso do transplante pulmonar depende de vários fatores, como o tempo de isquemia do órgão, condições clínicas do receptor, além do próprio ato de implantação do enxerto. Todas estas situações podem influenciar no aparecimento da lesão de isquemia e reperfusão (Kelly 2000, Lee et al., 2010). Esta lesão compreende uma série de fenômenos que decorrem da recirculação do sangue (reperfusão) em um órgão cuja circulação sanguínea foi interrompida temporariamente (isquemia). O produto final desta seqüência de eventos será a alteração da permeabilidade capilar cuja graduação será diretamente proporcional ao grau do dano isquêmico o qual, por sua vez, pode variar do edema intersticial até a ruptura vascular com hemorragia (Andrade 2001, de Perrot et al., 2004). Essa injúria é histologicamente caracterizada por edema pulmonar e extravasamento de neutrófilos (Reyes et al., 2006).

Devido à escassez de órgãos viáveis para transplante, vários autores têm descrito diferentes métodos para aumentar a viabilidade do enxerto pós-transplante e reduzir os efeitos indesejados da lesão de isquemia e reperfusão,

entre eles encontram-se o uso de substâncias antioxidantes, como a Melatonina e a N-Acetilcisteína (Sener et al., 2003, Inci et al., 2010). Vários estudos sugerem um papel central das Espécies Ativas de Oxigênio (EAO) na injúria por isquemia e reperfusão (IR) (Conte et al., 2000, Sun et al., 2011), que está marcada pelo aumento das EAO e de outros radicais livres, podendo ter papel crucial na sucessão de eventos que levam à falência pulmonar (Ucar et al., 2005). Acredita-se que a lesão de IR seja decorrente de um aumento das EAO, as quais desencadeiam uma resposta do enxerto resultando em uma ativação da resposta imune adaptativa (rejeição aguda) por meio da ativação de células apresentadoras de antígeno (Land 2005).

EAO são produtos do metabolismo normal da célula. As maiores fontes desses radicais são a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, o retículo endoplasmático e a nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADH/NADPH) oxidase associada à membrana. Em baixas concentrações, as EAO atuam como mediadores fisiológicos de resposta celular e reguladores da expressão gênica (Sanner et al., 2002). Em altas concentrações, podem gerar uma cascata bioquímica, produzindo lipoperoxidação (quando a molécula atacada é um lipídeo), oxidação de proteínas, dano de DNA, morte celular e contribuir para a ocorrência de situações patológicas (Liu et al., 1996, Liu et al., 1999). Com isso, o estresse oxidativo é definido pelo aumento da concentração das espécies ativas de oxigênio ou por uma diminuição dos níveis de antioxidantes. É caracterizado pela formação de EAO, tais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (McCord 1985), e tem sido identificado como um importante fator patológico em doenças cardiovasculares

(Singal et al., 2000), pulmonares e doenças auto-imunes, doenças metabólicas, câncer e envelhecimento (Heffner et al., 1989, Alho et al., 1998, Latini et al., 2003, Pettenuzzo et al., 2003).

Nos pulmões, as EAO estão relacionadas à ativação de processos inflamatórios por meio de fatores de transcrição, tais como o fator nuclear – kappa B (NF- κ B), levando ao remodelamento de cromatina e à expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios (Rahman et al., 2004, Chiang et al., 2008). A produção de EAO intracelulares têm sido observada em vários tipos celulares do tecido pulmonar, incluindo células endoteliais, epiteliais alveolares do tipo II, células claras, epiteliais ciliadas e macrófagos alveolares (Al-Mehdi et al., 1997).

Pesquisas em diferentes modelos animais têm se concentrado na prevenção da lesão de IR e na melhora dos métodos de preservação pulmonar (de Perrot et al., 2004, de Kerchove et al., 2010, Zhang et al., 2010). Entre esses métodos destacam-se: hiperinsuflação pulmonar (Puskas et al., 1992, D'Armini et al., 1994), preservação hipotérmica (Chien et al., 2000), soluções de preservação (Albes et al., 1997, Sakamaki et al., 1997), perfusão pulmonar por via retrógrada (Chen et al., 1996, Alvarez et al., 1999), ventilação líquida (Andrade et al., 2004), além da utilização de vasodilatadores (Bonser et al., 1991, Bhabra et al., 1996) e antioxidantes (Sagone et al., 1989, Egan et al., 1993).

A utilização de antioxidantes em modelos animais de lesão de injúria pulmonar tem sido pouco explorada em estudos experimentais e clínicos, tais como a utilização da N-Acetilcisteína (NAC), a qual demonstra ser um importante potencial terapêutico a ser utilizado na injúria de IR (Inci et al., 2010).

A NAC é um mucolítico que teve suas primeiras aplicações no tratamento de doenças congestivas e obstrutivas pulmonares associadas à hipersecreção. A NAC também é usada no tratamento de intoxicação aguda por acetaminofen e atualmente é utilizada no tratamento da síndrome da angústia respiratória no adulto e em casos de imunodeficiência adquirida na infecção por HIV (Sarnstrand et al., 1995).

Oferece proteção contra endotoxemia mediada pela administração de lipossacarídeo, observando diminuição de H_2O_2 , e isso estaria diretamente relacionado à sua capacidade de reduzir EAO, mais do que à sua função de promover a biossíntese de glutatona (Sprong et al., 1998). Muitos trabalhos têm demonstrado os efeitos da NAC, principalmente modulando a atividade da Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS), reduzindo a formação de citocinas inflamatórias e inibindo a ação de neutrófilos (Bakker et al., 1994, Cuzzocrea et al., 2000, Bergamini et al., 2001, Turut et al., 2009).

Muitos mecanismos mostram os efeitos antiinflamatórios da NAC. As espécies reativas de oxigênio, geradas por neutrófilos e macrófagos, ativam o NF- κ B, uma proteína regulatória de transcrição, resultando na excessiva

produção de citocinas, incluindo interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF) (Sigala et al., 2011, Csontos et al., 2012). Possui um papel regulador como “scavenger” de radicais livres, inibindo o estresse oxidativo e evitando a morte celular (Kim et al., 2004).

No presente estudo, utilizamos um modelo experimental de IR em ratos, afim de avaliarmos os danos ocasionados pelo evento e testar as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias da NAC na injúria de IR e sua subsequente melhora na viabilidade pulmonar.

2. Referencial Teórico

2.1 Disfunção Primária do Enxerto

A disfunção primária do enxerto é uma forma de dano pulmonar agudo que resulta de uma seqüência de eventos inerentes ao processo do transplante pulmonar como a morte cerebral do doador e os eventos relacionados diretamente ao enxerto como isquemia, preservação, transplante e reperfusão. Apesar de numerosos recentes avanços em preservação pulmonar, técnica cirúrgica e cuidados peri-operatórios, a disfunção do enxerto no pós-transplante ainda é prevalente com incidência entre 11% e 25% (King et al., 2000, Christie et al., 2003, Zaas et al., 2003).

Vários termos descrevem essa situação clínica tais como lesão de isquemia e reperfusão, resposta pós-implante, edema pós-implante, edema de reperfusão, edema pulmonar não cardiogênico, disfunção precoce do enxerto, disfunção primária do enxerto, falência primária do enxerto, síndrome da distrição respiratória aguda pós-transplante e dano pulmonar agudo. Essas expressões não são sinônimos sendo algumas utilizadas para descrever o evento terminal do dano de isquemia-reperfusão e outras referem-se a quadros clínicos menos graves (Christie et al., 2005). Mesmo com as variações presentes entre os estudos existe consenso que a disfunção primária do enxerto é responsável por grande morbidade e mortalidade no transplante pulmonar (Christie et al., 2005).

Idade, raça, sexo, história de tabagismo e doença pulmonar subjacente são características do doador que podem influenciar na qualidade do enxerto. Além disso, outros fatores presentes no doador como morte cerebral, ventilação mecânica prolongada, aspiração brônquica, pneumonia, trauma, politransfusão e instabilidade hemodinâmica contribuem para o dano pulmonar resultante da isquemia e reperfusão e, conseqüentemente, para a disfunção do enxerto (de Perrot et al., 2003, de Perrot et al., 2005).

Dessa forma, o tratamento e, principalmente, a prevenção da disfunção primária do enxerto são abordagens de suma importância no atual contexto dos programas de transplante pulmonar.

2.2 Lesão de Isquemia-Reperfusão

O dano tecidual de determinado órgão quando submetido à isquemia, é agravado no momento da sua reoxigenação pela reperfusão tecidual, a qual é considerada mais deletéria que a isquemia em si (Parks et al., 1986). Esse mecanismo de lesão tecidual recebe o nome de lesão de reperfusão ou lesão de isquemia-reperfusão (IR). Consiste em um fenômeno fisiopatológico complexo, necessitando da presença do oxigênio para sua gênese, bem como manutenção e ativação de fatores vasculares, humorais e celulares.

A isquemia determina nas células uma série de alterações que podem culminar com suas mortes. A ausência de oxigênio impede a fosforilação oxidativa na mitocôndria. A glicólise anaeróbica torna-se o meio de obtenção de energia e, sendo menos eficiente, não é adequada para a reposição do

trifosfato de adenosina (ATP) consumido. O déficit de ATP prejudica o transporte ativo de íons através da membrana, levando a um acúmulo de sódio e, por difusão, água no interior da célula, com conseqüente edema. Esse desequilíbrio ocorre também no interior das organelas, levando ao edema e desintegração das mitocôndrias, expansão e formação de vesículas no retículo endoplasmático. A ruptura de lisossomos e liberação de enzimas contidas no seu interior representam eventos finais antes da morte celular (Pegg 1986).

A isquemia determina um aumento da permeabilidade ao cálcio, promovendo sua entrada na célula. O aumento do cálcio intracelular, potencializado pela diminuição de seu transporte ativo para o meio extracelular, dependente de ATP, apresenta vários efeitos deletérios: alteração da forma da célula por contração do citoesqueleto; ativação de fosfolipases, com conseqüente liberação de metabolitos do ácido araquidônico a partir da membrana celular e das organelas e produção de radicais livres. Todos estes efeitos contribuem para a morte celular (Okuda et al., 1992, Waxman 1996).

As células endoteliais e os leucócitos, elementos fundamentais na lesão de reperfusão, são afetados já na isquemia, sofrendo alterações que se intensificarão na reperfusão. A importância dessas alterações torna-se ainda maior pelo fato dessas células estarem presentes em todos os tecidos, tornando-os vulneráveis a lesão de reperfusão. Quando expostas a hipóxia, as células endoteliais alteram seus citoesqueletos e sua morfologia, formando pequenos poros intercelulares. A presença destes poros determina um aumento da permeabilidade do endotélio, com formação de edema tecidual (Ogawa et al., 1990). A piora da perfusão torna-se potencializada por um

desequilíbrio na produção de fatores vasoconstritores e vasodilatadores. O endotélio hipóxico tem aumento na produção de potentes vasoconstritores (endotelinas tipos 1, 2 e 3) e diminuição na produção de vasodilatadores (óxido nítrico).

A célula endotelial, quando exposta a isquemia, aumenta sua produção de interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), aumentando sua adesividade para leucócitos, embora esse fenômeno seja mais evidente após a reoxigenação. Esses mediadores aumentam a expressão pelo endotélio da molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e da E-selectina (Sherry et al., 1988, Shreeniwas et al., 1992). Outros fatores produzidos pelo endotélio sob hipóxia também favorecem a migração, adesão e ativação de leucócitos, entre eles a interleucina-8 e o fator de ativação plaquetária (Baggiolini et al., 1989, Arnould et al., 1993). Por outro lado, os leucócitos também sofrem alterações induzidas pela hipóxia que facilitam sua adesividade ao endotélio. A hipóxia induz uma maior expressão das moléculas de adesão leucocitária, particularmente as integrinas CD11 e CD18 (Scannell 1996). Essas alterações iniciadas na isquemia, sobretudo sobre as células endoteliais e leucócitos, não só determinam lesão tecidual, mas também criam condições que favorecem futuras lesões com a ocorrência da reperfusão.

Além desses mecanismos de lesão direta dos tecidos, com a isquemia, iniciam-se outros fenômenos que poderão ampliar a lesão após a reperfusão. A degradação dos estoques de ATP para a produção de energia durante a isquemia leva a um aumento nos níveis intracelulares de hipoxantinas.

Paralelamente, durante a isquemia há a conversão de xantina deidrogenase, enzima que metaboliza a hipoxantina através da oxidação do dinucleotídeo fosfato de nicotinamida (NADP), em xantina oxidase. Essa conversão se faz de maneira irreversível, através de proteases ativadas pelo cálcio, ou de maneira reversível, através da oxidação de grupos sulfidríla. A xantina oxidase depende do oxigênio para a metabolização da hipoxantina e, quando este é fornecido pela reperfusão, formam-se como subprodutos os radicais livres de oxigênio (RLO), oxidantes com grande capacidade de lesão tecidual (McCord 1985, Grisham et al., 1986, Parks et al., 1988, Zimmerman et al., 1994).

Outro efeito já demonstrado após um período de isquemia é a falência de reperfusão de determinados segmentos da microcirculação, gerando uma heterogeneidade na distribuição do fluxo sanguíneo, com hipóxia tecidual focal. Esse fenômeno, denominado não-reperfusão (no-reflow), constitui-se em mais um mecanismo de lesão tecidual após a restauração da reperfusão do tecido (Menger 1995).

Vários fatores estão implicados no fenômeno de não-reperfusão. A compressão do leito capilar pelas células teciduais e endoteliais e também pelo interstício, todos edemaciados durante a isquemia, é um importante fator. Outras hipóteses consideram a oclusão dos capilares por trombos, aglomerados de leucócitos, plaquetas ou hemácias e hemoconcentração, desequilíbrio entre substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, como responsáveis pela não restauração do fluxo sanguíneo (Jerome et al., 1994, Conger et al., 1995).

2.3. Radicais livres e espécies reativas de oxigênio

O oxigênio é um elemento vital e também potencialmente nocivo para as células. Em certas condições, é responsável por reações químicas extremamente tóxicas (Boveris et al., 1973).

A molécula de oxigênio em seu estado natural é um birradical que possui dois elétrons em *spin* de mesmo sentido (elétron gravita na mesma direção), o que lhe confere certa estabilidade e lhe impede de agir como um radical livre. Sendo que esta condição lhe confere características de potente oxidante, ou seja, aceitando elétrons de outras moléculas (Barp et al., 2002).

O termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Este desarranjo de elétrons na última camada é responsável pela alta reatividade desses átomos ou moléculas (Southorn et al., 1988). A sua formação deve-se a reações de óxido-redução, isto é, podem ceder o elétron solitário, oxidando-se, ou receber outro elétron, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres provocados ou resultantes dessas reações de óxido-redução, são divididos em radicais livres de nitrogênio e oxigênio. Nem todas as formas de radicais livres apresentam elétrons desemparelhados na última camada, portanto, as espécies do metabolismo do oxigênio serão denominadas de “espécies reativas do oxigênio” (ERO) (Ferreira et al., 1997).

As ERO estão presentes em todos os sistemas biológicos. Durante o metabolismo celular aeróbico, em um ambiente fisiológico, o O_2 sofre redução tetravalente na mitocôndria, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . As reações desse processo formam os seguintes compostos reativos intermediários: superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2^\cdot), hidroxila (OH^\cdot), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A “entrada” de quatro elétrons neutraliza a reatividade desses compostos (Figura 1). O oxigênio *singlet* (1O_2) é a forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados na última camada (Ferreira et al., 1997).

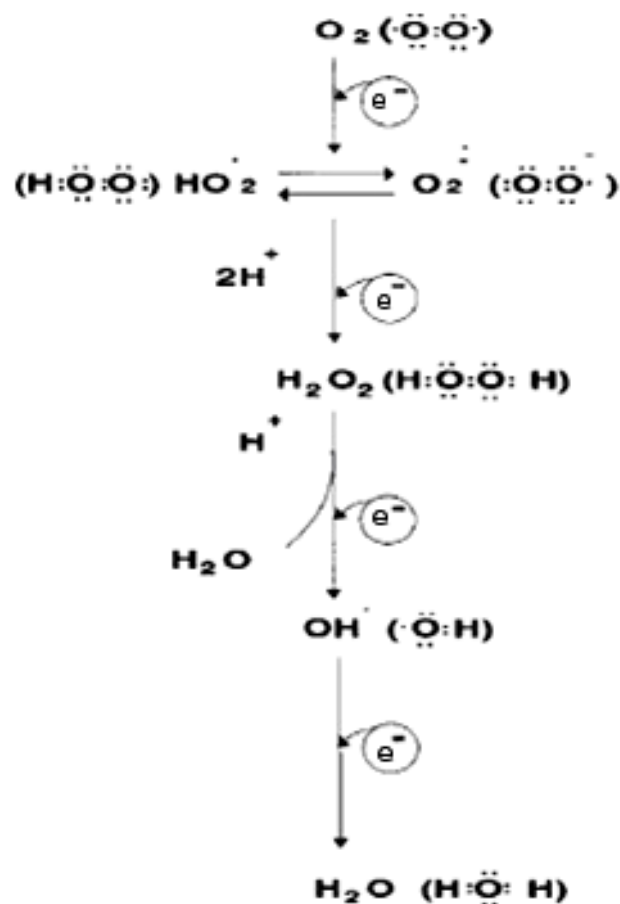


Figura 1. Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas neste processo. Adaptado de Ferreira e cols. (Ferreira et al., 1997).

O radical O_2^- é formado após a primeira redução do O_2 , sendo produzido durante a ativação de células inflamatórias. A HO_2^\cdot é considerada mais reativa que o O_2^- em virtude de sua facilidade em reagir com membranas biológicas. No entanto, a OH^\cdot é considerada a ERO com maior reatividade, podendo inativar proteínas ou oxidar ácidos graxos da membrana celular no local onde é gerada ou mesmo reagir com as moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA) (Ferreira et al., 1997).

2.3.1. Estresse oxidativo e lesão de isquemia-reperfusão

Em 1981, Granger *et al.* publicaram um dos primeiros estudos que demonstrou a participação do radical superóxido (O_2^-) na lesão isquêmica através de um modelo de isquemia intestinal em gatos (Granger et al., 1981).

O estresse oxidativo possui papel na patogenia de várias condições clínicas como doenças malignas, diabetes *mellitus*, aterosclerose, inflamação crônica, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e lesão de isquemia-reperfusão (Droge 2002). Tem-se demonstrado que há diferentes vias de produção das ERO, destacando-se a via da xantina-oxidase como fonte primária de produção na maioria dos órgãos com vascularização sistêmica (McCord 1985). Na matriz mitocondrial, através da cadeia de transporte de elétrons também ocorre a formação de ERO pela redução do oxigênio molecular a O_2^- (Dalton et al., 1999).

Durante a isquemia tecidual, ocorre uma redução da disponibilidade do trifosfato de adenosina (ATP) em decorrência da sua degradação em difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP), adenosina, inosina e finalmente hipoxantina. Além disso, ocorre a conversão da xantina-desidrogenase em xantina-oxidase. Essa reação pode ocorrer por dois mecanismos: 1) a xantina-desidrogenase pode ser reversivelmente convertida para xantina-oxidase por oxidação de grupos sulfidrilas ou 2) a xantina-desidrogenase pode ser irreversivelmente convertida para xantina-oxidase por proteólise, através de proteases ativadas pelo cálcio que está aumentado no citosol, oriundo do meio extracelular (McCord et al., 1982, Zimmerman et al., 1994).

A xantina-desidrogenase utiliza o dinucleotídeo fosfato de nicotinamida (NADP) ao oxigênio, como receptor de elétron durante a oxidação dos metabólitos das purinas (hipoxantina, xantina). A xantina-oxidase depende do oxigênio para a metabolização da hipoxantina e, quando este é fornecido pela reperfusão (reoxigenação), formam-se as ERO, moléculas com grande capacidade de lesão tecidual (Zimmerman et al., 1994) (Figura 2).

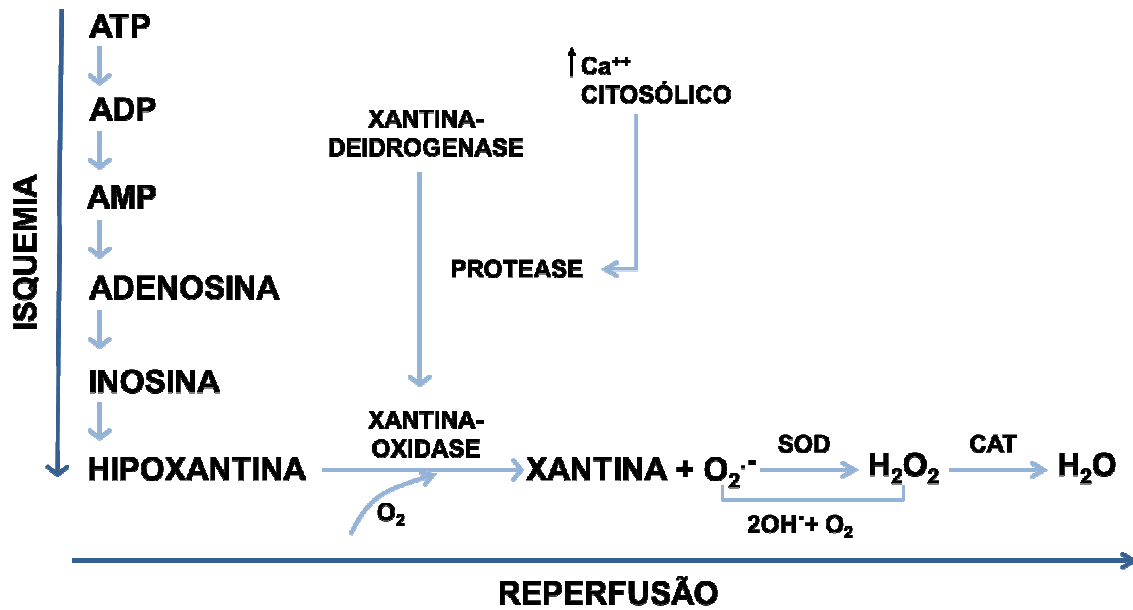


Figura 2. Geração das ERO a partir da ação da xantina-oxidase sobre a hipoxantina em condições de isquemia e reperfusão. Adaptada de Pinheiro e colaboradores (Pinheiro et al., 1999).

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é formado quando o oxigênio é reduzido por um elétron. A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a conversão do $O_2^{\cdot-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto a catalase converte o H_2O_2 em água e oxigênio. No entanto, em presença de disponibilidade de íons ferro ou cobre, pode ocorrer a conversão do H_2O_2 no radical hidroxila (OH^{\cdot}), molécula extremamente reativa, através das reações de Fenton e de Haber-Weiss. (Zimmerman et al., 1994) (Ferreira et al., 1997) (Figura 2 e 3).

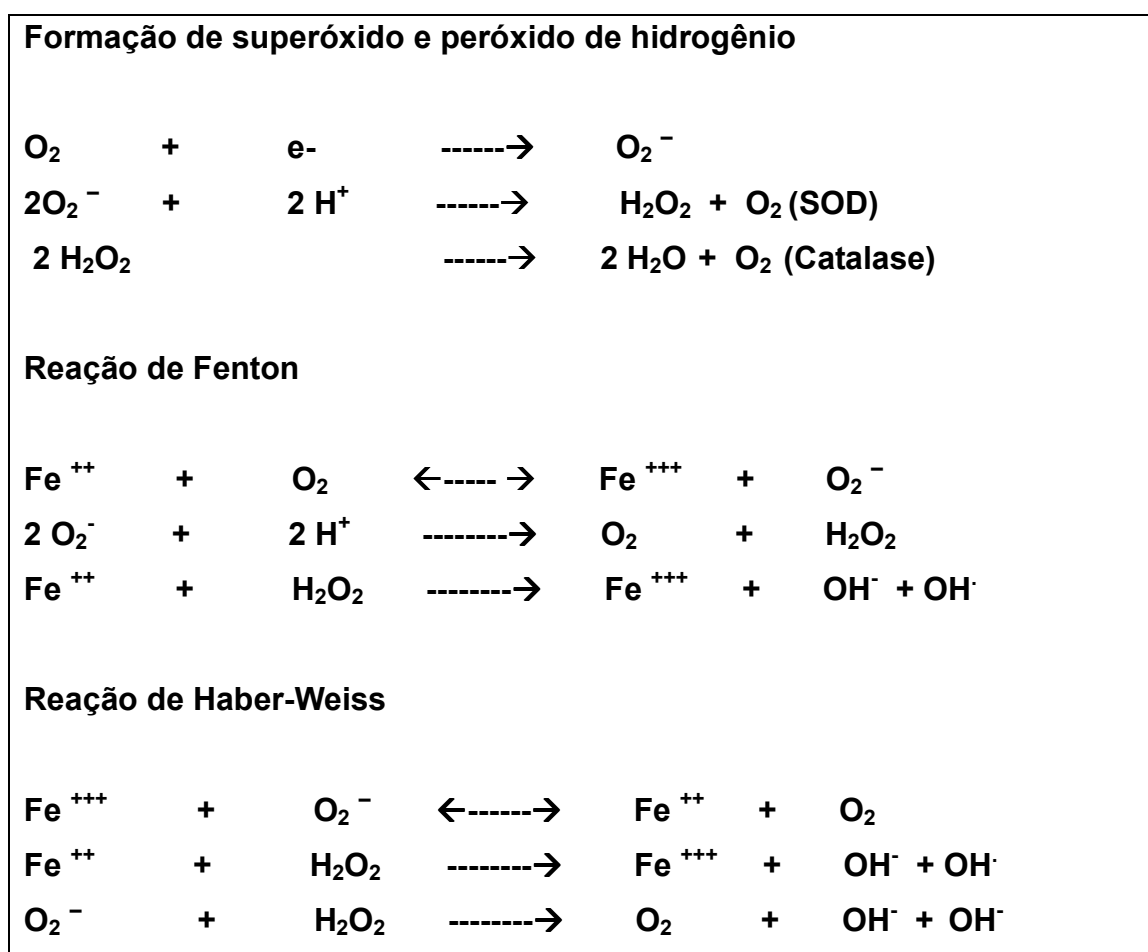


Figura 3. Reações químicas responsáveis pela formação das espécies reativas de do oxigênio. SOD: superóxido dismutase, Fe^{++} : íon ferroso, Fe^{+++} : íon férrico.

Experimentos *in vivo* sugerem que a lesão de IR, em corações de ratos submetidos à sobrecarga de Fe^{+++} , possa estar relacionada à produção de ERO via reação de Haber-Weiss. (van der Kraaij et al., 1988).

2.3.2. Estresse oxidativo e lesão de isquemia-reperfusão pulmonar

O fenômeno isquemia-reperfusão (IR) ocorre no coração, fígado, rim, intestino, sistema nervoso central, músculo esquelético, entre outros órgãos

(Droge 2002). Nesses órgãos a isquemia é acompanhada de anóxia tecidual até a reintrodução do oxigênio na reperfusão, sendo, dessa forma, a IR equivalente a anóxia-reoxigenação. Ao contrário dos outros órgãos, o pulmão é considerado o único órgão que pode sofrer isquemia sem hipóxia, pois o oxigênio alveolar ajuda a manter o metabolismo aeróbico evitando hipóxia. Dessa forma, no pulmão o estresse oxidativo resultante da isquemia deveria ser diferenciado daquele resultante da hipóxia propriamente dita (de Perrot et al., 2003).

O estresse oxidativo, caracterizado pela formação de ERO ocorre na maioria das células pulmonares. Há basicamente dois mecanismos que geram sua produção, o primeiro seria aquele relacionado ao acúmulo de hipoxantina e a conversão de xantina desidrogenase em xantina oxidase durante a anóxia, e posterior degradação da hipoxantina em superóxido no momento da reoxigenação. O segundo mecanismo seria aquele dependente do sistema NADPH oxidase presente no endotélio e na membrana plasmática de neutrófilos e macrófagos, responsável por catalisar a redução do oxigênio em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2^-) (de Perrot et al., 2003) (Figura 4).

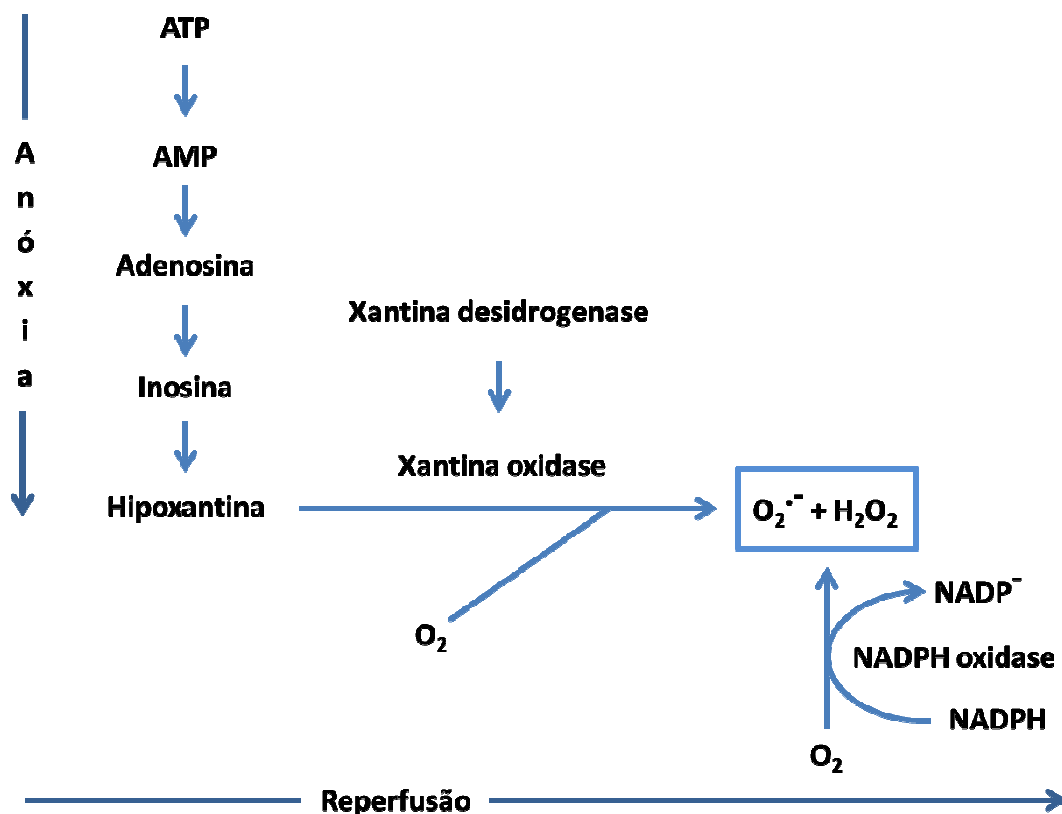


Figura 4. Formação de espécies reativas do oxigênio durante a isquemia-reperfusão e a anóxia-reoxigenação no pulmão. Modificado de de Perrot e colaboradores (de Perrot et al., 2003).

Em relação ao transplante pulmonar, fatores presentes na fase pré-reperfusão do enxerto como: morte cerebral, pneumonia, ventilação mecânica, aspiração, contusão, hipotensão e isquemia fria têm sido reconhecidos como agravantes da lesão de isquemia reperfusão através da ativação de fatores inflamatórios (Novick et al., 1996, de Perrot et al., 2003).

Hipóxia e conseqüentemente anóxia resultam em decréscimo no ATP intracelular e aumento nos produtos de degradação do ATP como a hipoxantina, o que gera a produção de ERO quando o oxigênio é reintroduzido na reperfusão e/ou ventilação. Durante a isquemia, esse fenômeno pode ocorrer no pulmão se a tensão de oxigênio alveolar cair abaixo de 7 mmHg

(Puskas et al., 1992, Date et al., 1993). A ausência de fluxo sanguíneo pulmonar leva a peroxidação lipídica mesmo com a presença de oxigênio. O mecanismo do estresse oxidativo é diferente do que ocorre durante a anóxia-reoxigenação porque não está associado a diminuição de ATP, podendo ocorrer mesmo durante o período de isquemia fria em um órgão acondicionado para transplante (Eckenhoff et al., 1992).

2.3.3. Peroxidação lipídica

Os lipídios, as proteínas e os ácidos nucleicos são responsáveis pela estrutura celular e alvos de reação das ERO. Dessa forma, qualquer componente celular é suscetível à ação das ERO, porém as membranas celulares por sua composição e localização são uma das organelas mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica. A reação das ERO com os ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular promove a formação de vários radicais lipídicos: peróxidos lipídicos, hidroperóxidos lipídicos, conjugados dienos e malondialdeído. Esse evento acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, levando a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, culminando com a lise celular (Ferreira et al., 1997). O radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) é reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação, além disso já foi demonstrada a necessidade de uma relação equimolar $\text{Fe}^{+++} : \text{Fe}^{++}$ no meio, para que ocorra a peroxidação lipídica (Minotti et al., 1987) (Figura 5).

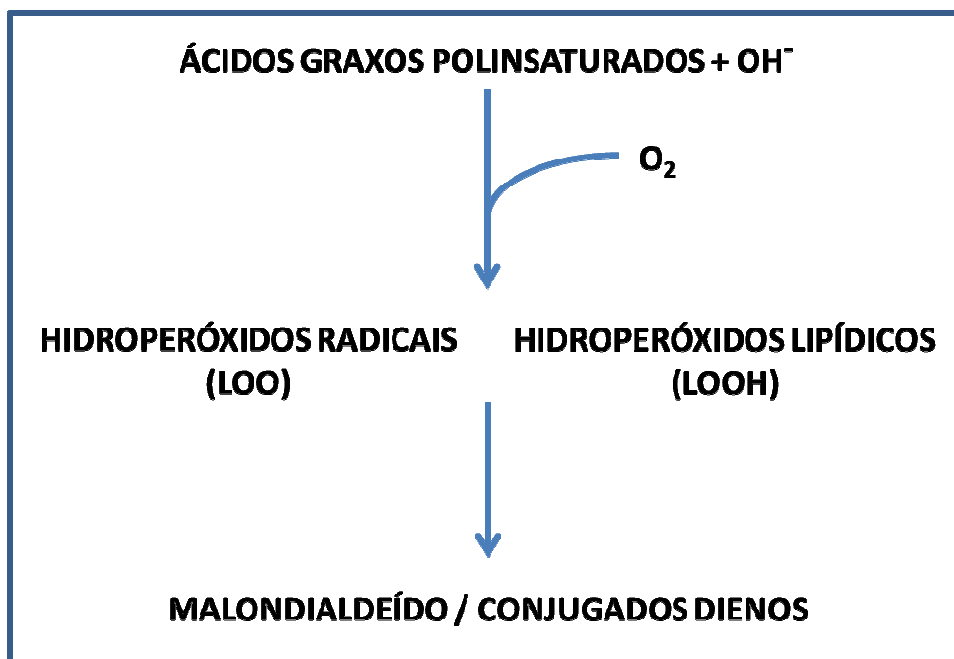


Figura 5. Peroxidação lipídica da membrana celular iniciada pelo radical hidroxila.

2.3.4. Sistema de defesa antioxidante

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato de maneira enzimático ou não enzimático (Halliwell 1989).

A defesa do organismo contra as ERO vai desde prevenção da formação das ERO, interceptação dos radicais formados, a reparo das células danificadas. Os sistemas que previnem a formação de ERO são considerados biomoléculas ligantes de metais (Fe^{2+} e Cu^+), ou seja, são os quelantes. A presença de proteínas quelantes é de vital importância aos seres vivos, pois previne as células de processos oxidativos catalisados por íons metálicos.

Pigmentos especializados previnem a ação da radiação ultravioleta, a melanina e os carotenóides impedem a ação do oxigênio *singlet*. As enzimas que controlam os níveis de ERO são: Glutathione peroxidase (GPx), Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT), sendo a interceptação a desativação das ERO, quando elas são neutralizadas de forma a impedir a oxidação posterior de outras moléculas. A neutralização final de um composto com um ou mais elétrons não emparelhados consiste na formação de outro produto não radical. O interceptador (antioxidante) mais eficiente deve combinar propriedades ótimas, as quais reagem com RL iniciais, tais como, radicais peróxil (ROO[•]) e, posteriormente, interagem com compostos hidrossolúveis para a sua própria regeneração (Halliwell 2007).

Os compostos hidrossolúveis transferem a função radical para longe do sítio-alvo potencial e são chamados *scavengers* de RL. A combinação de uma substância com um RL leva à formação de um não radical ou um radical menos lesivo como, por exemplo, tocoferóis e carotenóides. As substâncias que funcionam como *quencher*s de oxigênio *singlet* são aquelas que absorvem a energia de excitação e a liberam em forma de calor ou movimento (Halliwell 2007).

A terapia antioxidante pode ser feita pela reposição de antioxidantes endógenos, como superóxido dismutase recombinante (Leite et al., 2003), pela suplementação exógena com agentes com propriedades antioxidantes, como a N- acetilcisteína (NAC) (Paterson et al., 2003).

2.3.5. N- acetilcisteína (NAC)

A NAC é um composto tiólico que contém um grupo sulfidril formado pela seguinte fórmula química $C_5H_9NO_3S$, seu peso molecular é igual a 163,2 e é amplamente usado na clínica médica (Ziment 1988) (Figura 6). A NAC é um mucolítico que teve suas primeiras aplicações no tratamento de doenças congestivas e obstrutivas pulmonares associadas à hipersecreção. A NAC também é usada no tratamento da síndrome da angústia respiratória no adulto e em casos de imunodeficiência adquirida na infecção por HIV (Sarnstrand et al., 1995). Sua atividade antioxidante é dada principalmente por dois mecanismos:

- Reduzir diretamente o H_2O_2 e o $O_2^{\bullet-}$ a espécies menos reativas formando radicais sulfúricos ou cisteína;
- Promover a biossíntese de GSH que funciona como *scavenger* de RL ou como substrato no ciclo redox da glutathiona (Aruoma et al., 1989).

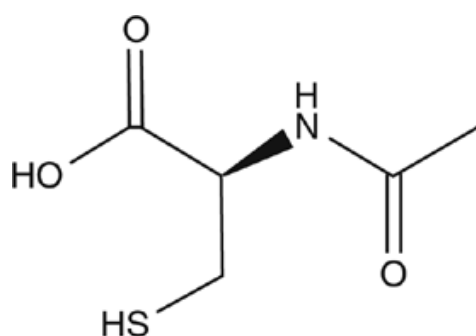


Figura 6. Estrutura molecular da N-acetilcisteína (NAC). Fonte: (Tepel 2003)

A perda da capacidade antioxidante em uma célula oxidada é devido principalmente a um decréscimo de glutathiona, pois esta é o tiol livre intracelular mais abundante. O estresse oxidativo *in vivo* é traduzido como deficiência de

glutathiona ou de seu precursor, cisteína. O antioxidante mais eficaz que vem sendo estudado é a NAC, que é um precursor de Glutathiona (Zafarullah et al., 2003). Quimicamente, a NAC é similar a cisteína. A presença do meio acetil reduz a reatividade desse tiol comparado a cisteína. A NAC é menos tóxica, menos suscetível a oxidação e dimerização e é mais solúvel em água, fazendo dela uma fonte melhor de cisteína que a própria administração parenteral de cisteína (Bonanomi et al., 1980)

2.4. Cálcio e bomba de sódio na lesão de isquemia-reperfusão

Em decorrência da isquemia, ocorre no meio intracelular consumo dos “estoques” de ATP, dessa forma há um aumento dos produtos da glicólise anaeróbica. Esse evento prejudica o gradiente de íons transmembrana com conseqüente acúmulo de sódio (Na^+) e água, levando ao edema da célula e de organelas como a mitocôndria sendo culminado com a lise celular. A bomba de sódio (Na^+/K^+ ATPase) permanece inativa durante a isquemia contribuindo com a disfunção no gradiente iônico (Ware et al., 1999). Em 1989, Wang et al. demonstraram que a preservação pulmonar a 10°C era superior a 15°C e a 4°C por ser uma temperatura mais adequada para o funcionamento da bomba de sódio (Na^+/K^+ ATPase) (Wang et al., 1989).

O acúmulo do íon cálcio (Ca^{++}) no meio intracelular resultante das alterações de permeabilidade da membrana plasmática e da diminuição de seu transporte ativo dependente de ATP resulta em ativação de fosfolipases e proteases (Okuda et al., 1992). As proteases potencializam os efeitos das ERO

sobre as organelas por converterem a xantina desidrogenase em xantina oxidase (figura 2), já as fosfolipases ativam a transformação do ácido araquidônico em produtos como leucotrienos, prostaglandinas e tromboxano (Okuda et al., 1992). O bloqueador do canal de cálcio verapamil apresenta efeito protetor durante o evento de isquemia-reperfusão (Yokomise et al., 1990, Swoboda et al., 1993).

2.5. Endotélio

O endotélio é a principal fonte de ERO durante a isquemia pulmonar não hipóxica através da ativação da NADPH oxidase. Esse complexo enzimático é também encontrado em outras células pulmonares, mas sua concentração é mais evidente nos neutrófilos, monócitos e macrófagos alveolares. A estimulação celular durante a isquemia resulta em translocação de componentes da NADPH oxidase para a membrana celular onde ocorre uma integração com componentes de membrana para formar um sistema de transferência de elétrons que catalisa a redução do oxigênio molecular (O_2) a superóxido (O_2^-), enquanto oxida o NADPH. O aumento no consumo de O_2 e na produção de O_2^- são os responsáveis pela “explosão oxidativa” resultante da ativação da NADPH. O O_2^- pode ser posteriormente transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em reação catalisada pela superóxido dismutase. Compostos oxidantes são produzidos também através de enzimas contidas em grânulos intracelulares. Os grânulos azurofílicos liberam a enzima mieloperoxidase (MPO) que durante ativação neutrofílica catalisa a reação entre o H_2O_2 e o cloro produzindo ácido hipoclorídrico, considerado um oxidante extremamente potente. Além disso, o ácido hipoclorídrico pode reagir

com as aminas gerando as cloraminas, consideradas potentes oxidantes (Figura 7) (Chatterjee et al., 2004).

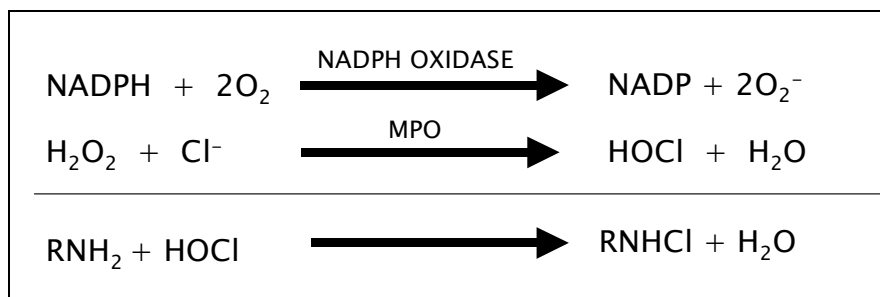


Figura 7. Produção de ERO pelos leucócitos. MPO- mieloperoxidase.

2.6. Ferro

O íon ferro é liberado da ferritina e do citocromo p-450 durante a isquemia por efeito da acidose, da ação do radical superóxido e proteólise. Além disso, quando liberado na circulação pode ativar a agregação plaquetária. Um estudo experimental, utilizando modelo de isquemia-reperfusão em cachorros com isquemia quente de 3 horas mostrou que um novo tipo de lazaróide é capaz de diminuir a peroxidação lipídica dependente de ferro (Takeyoshi et al., 2001).

2.7 Mediadores Inflamatórios

O dano celular gerado pelas ERO na membrana lipídica promove a ativação da fosfolipase A_2 , induzindo a produção do fator de ativação plaquetário (PAF) que promove a mobilização do ácido araquidônico dos fosfolípidios da parede celular. O ácido araquidônico é o substrato de numerosas enzimas e no pulmão é primeiramente metabolizado por duas vias: a da cicloxigenase e a da 5-lipoxigenase, gerando mediadores inflamatórios. A

via da cicloxigenase produz prostaglandinas (PGE₁ e PGI₂) e tromboxano (TXA₂); e a via da 5-lipoxigenase gera leucotrienos tais como leucotrieno B₄, C₄, D₄ e E₄ (Farrukh et al., 1988, Uhlig et al., 2005).

A resistência vascular pulmonar depende da interação entre vasoconstritores e vasodilatadores. A maioria dos metabólitos do ácido araquidônico são resultantes das células endoteliais e contribuem para manter a baixa resistência vascular no pulmão. Os efeitos das prostaglandinas e dos tromboxanos são antagônicos. A prostaciclina (PGI₂) é um broncodilatador, vasodilatador pulmonar e impede a agregação de plaquetas, enquanto que o tromboxano A₂ (TXA₂) é um bronco e vasoconstritor e induz agregação plaquetária (Farrukh et al., 1988). As prostaglandinas (PGE₁ e PGI₂) estão associadas aos seguintes efeitos: vasodilatação e broncodilatação; inibição de agregação plaquetária, sequestro e aderência leucocitária; além de supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6) (Matsuzaki et al., 1993, DeCampos et al., 1998, de Perrot et al., 2001).

O PAF pode ser liberado de várias células como macrófagos, plaquetas, mastócitos, células endoteliais e neutrófilos, sendo responsável pela ativação leucocitária, agregação plaquetária, liberação de citocinas e expressão de moléculas de adesão (Drost et al., 2002). A PAF acetilhidrolase é responsável pela degradação e regulação da atividade do PAF. Níveis elevados dessa enzima foram encontrados no lavado broncoalveolar de pacientes com Síndrome da Distrição Respiratória (Grissom et al., 2003). Além disso, tem sido observado, que esta substância, quando adicionada a uma solução de

preservação pulmonar em modelo de perfusão isolada tem a capacidade de reduzir a permeabilidade capilar pulmonar (Baek et al., 2000).

Os leucotrienos, produtos do metabolismo do ácido araquidônico pela via da 5-lipoxigenase são divididos em duas classes: os cisteínicos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) e o não cisteínico (LTB₄). O LTB₄ é um potente ativador pró-inflamatório, quimiotático de leucócitos tendo um importante papel na lesão pulmonar de IR, sendo produzido por monócitos, linfócitos, mastócitos e macrófagos pulmonares (Yoshimura et al., 1994). O uso de um antagonista do LTB₄, o U-75302, em modelo de dano oxidativo por hiperóxia em porcos da índia mostrou que ocorre uma menor infiltração leucocitária e menor permeabilidade microvascular no parênquima pulmonar quando na presença de hiperóxia (Phillips et al., 1995).

2.7.1. Fator de Transcrição Nuclear kappa B

A família do fator nuclear kappa B (NF-κB) compõe-se de cinco membros: REL-a (p65), NF-κB1 (p50; p105), NF-κB2 (p52; p100), c-REL e REL-b (Ghosh et al., 1998). Essas subunidades, exceto a REL-b, são homo ou heterodímeros que formam o NF-κB. O mais comum ativado em reações inflamatórias é o heterodímero de p50 e p65 (Souza et al., 2012).

A transcrição nuclear do NF-κB é regulada pela ação inibitória do inibidor de proteínas κB (IκB), que é alvo para degradação pela via de fosforilação pela ação de quinases IκB (IKKα, IKKβ) (Nath et al., 2012). A sinalização inflamatória ativa uma cascata de evento, como a fosforilação do receptor TNF

que leva à ativação do fator de crescimento transformante-b-quinase ativada 1 (TAK1) que fosforiza o complexo IKK e em seguida fosforiza a proteína I κ B α , resultando em ubiquinação, dissociação de I κ B α com NF- κ B e degradação de I κ B α pelo proteossoma. O NF- κ B se desloca para o núcleo e liga-se com a banda específica de DNA, inicializando a transcrição de múltiplos genes, incluindo citocinas, quimocinas e outros mediadores inflamatórios (Figura 8) (Souza et al., 2012).

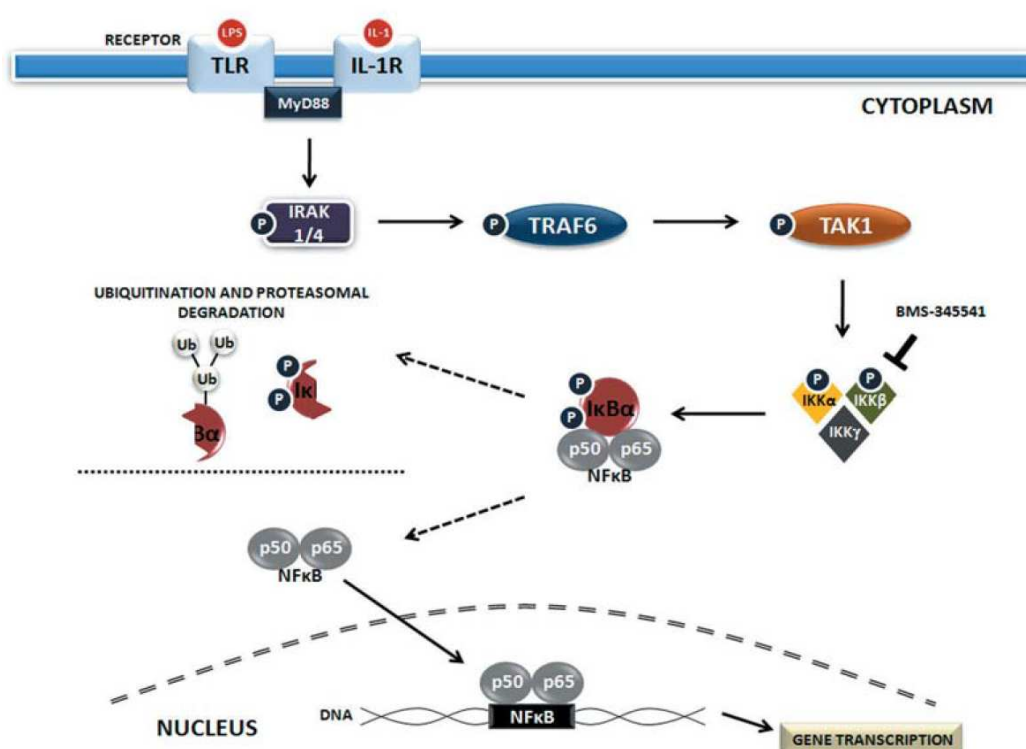


Figura 8. Ativação do Fator de transcrição nuclear kappa B. Fonte: Souza et al. 2012.

O NF- κ B é um fator de transcrição que desempenha importante e determinante papel, tanto em situações normais como na coordenação de respostas imunes adaptáveis, regulando a expressão de muitos mediadores celulares (Dalton et al., 1999). Este fator foi descrito primeiramente em 1986

por Sen e Baltimore (Sen et al., 1986) como sendo capaz de ligar-se a sítios específicos kappa como *enhancer* nas regiões promotoras dos genes das imunoglobulinas em células B (McCord et al., 1982). É reconhecido que o NF- κ B é expresso na maioria dos tipos celulares, sendo constituído por um dímero composto dos membros da família da Rel. Em células em homeostase o NF- κ B se mantém no citoplasma em sua forma inativa, associado com as proteínas inibidoras do sítio κ B, denominadas inibidores κ B (I κ B).

O NF- κ B pode ser ativado por uma variedade de sinais relevantes, conforme a etiologia e a fisiopatologia inflamatórias (Dalton et al., 1999). Para sua ativação são necessários estímulos intracelulares e/ou extracelulares, podendo ser desencadeados pelos seguintes agentes: produtos bacterianos (endotoxinas, peptidoglicanos), vírus e componentes virais, protozoários, citocinas (TNF- α), interleucinas, radicais livres e/ou oxidantes (Dalton et al., 1999).

Segundo Ishiyama e colaboradores (Ishiyama et al., 2005) os quais estudaram a inibição da ativação do NF- κ B através da transferência de genes inibidores da forma supressora do inibidor I κ B evidenciaram o aumento na oxigenação do pulmão transplantado, redução do edema pulmonar e agregação neutrofílica assim como a redução nas células apoptóticas após o transplante pulmonar experimental.

Desta forma, Chang e colaboradores (Chang et al., 2000), demonstraram que a inibição do NF- κ B atenua a lesão de IR assim como era

responsável pela redução na produção de citocinas. Em seu estudo, a ativação do NF- κ B foi responsável pelo aumento na expressão da caspase 3 e iNOS.

2.7.2 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador biológico produzido por vários tipos de células, inclusive o endotélio vascular. É considerado um mensageiro transcelular ideal por sua natureza lipofílica e pela curta meia-vida no sistema biológico, em torno de 3 a 30 segundos (Hart 1999). O NO é sintetizado a partir da L-arginina, um aminoácido que é seu precursor natural, do oxigênio molecular, NADPH e outros co-fatores pela ação da enzima óxido nítrico-sintetase (NOS) (Liu et al., 2000). Além da sua potente ação vasodilatadora é um inibidor da agregação plaquetária e da aderência neutrofílica e modulador da permeabilidade vascular. Além disso, possui ações como broncodilatador e neurotransmissor (Mehta 2005).

Após a IR pulmonar, o nível de NO endógeno é reduzido. Esse efeito pode estar associado ao aumento da expressão da NOS endotelial, o que sugere que o NO endógeno produzido pode ser destruído rapidamente por ERO após a reperfusão, e/ou porque a IR pode induzir a geração de inibidores de NOS (Le Cras et al., 2001). A diminuição da produção do NO endógeno pela reação imediata do NO com o radical superóxido resulta na produção de um poderoso oxidante, o peroxinitrito (OONO \cdot). Essa perda da ação protetora do NO resultará em disfunção endotelial (Hart 1999).

O uso de NO como método de preservação demonstrou-se eficaz em diminuir o dano da lesão de reperfusão em vários modelos animais. (Yamagishi et al., 1999, Yamashita et al., 2004, Ovechkin et al., 2005, Esme et al., 2006). Entretanto, o uso de NO na reperfusão pulmonar não diminuiu o edema pulmonar em um ensaio clínico randomizado (Perrin et al., 2006). Em outro estudo com 84 pacientes submetidos a transplante pulmonar, o uso do NO na reperfusão não mostrou benefício em relação à hemodinâmica, extubação, incidência de lesão de IR e tempo de internação hospitalar e UTI (Meade et al., 2003). Já Ardehali e colaboradores (Ardehali et al., 2001), demonstraram que o uso do NO inalatório no pós-operatório apresentou benefício em um subgrupo de pacientes que desenvolveram lesão de IR, apesar de não diminuir sua incidência (Ardehali et al., 2001).

2.7.3. Ativação leucocitária

A lesão de IR em transplante possui um padrão bifásico. A fase precoce da reperfusão, dependente principalmente das características do doador e a fase tardia, dependente das características do receptor e com duração de 24 horas. Os macrófagos do doador, ativados durante a isquemia são os mediadores da fase precoce, enquanto os linfócitos e neutrófilos do receptor estão envolvidos principalmente na fase tardia. O recrutamento dessas células ocorre pela liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios antes e após a reperfusão (Fiser et al., 2001) (figura 9)

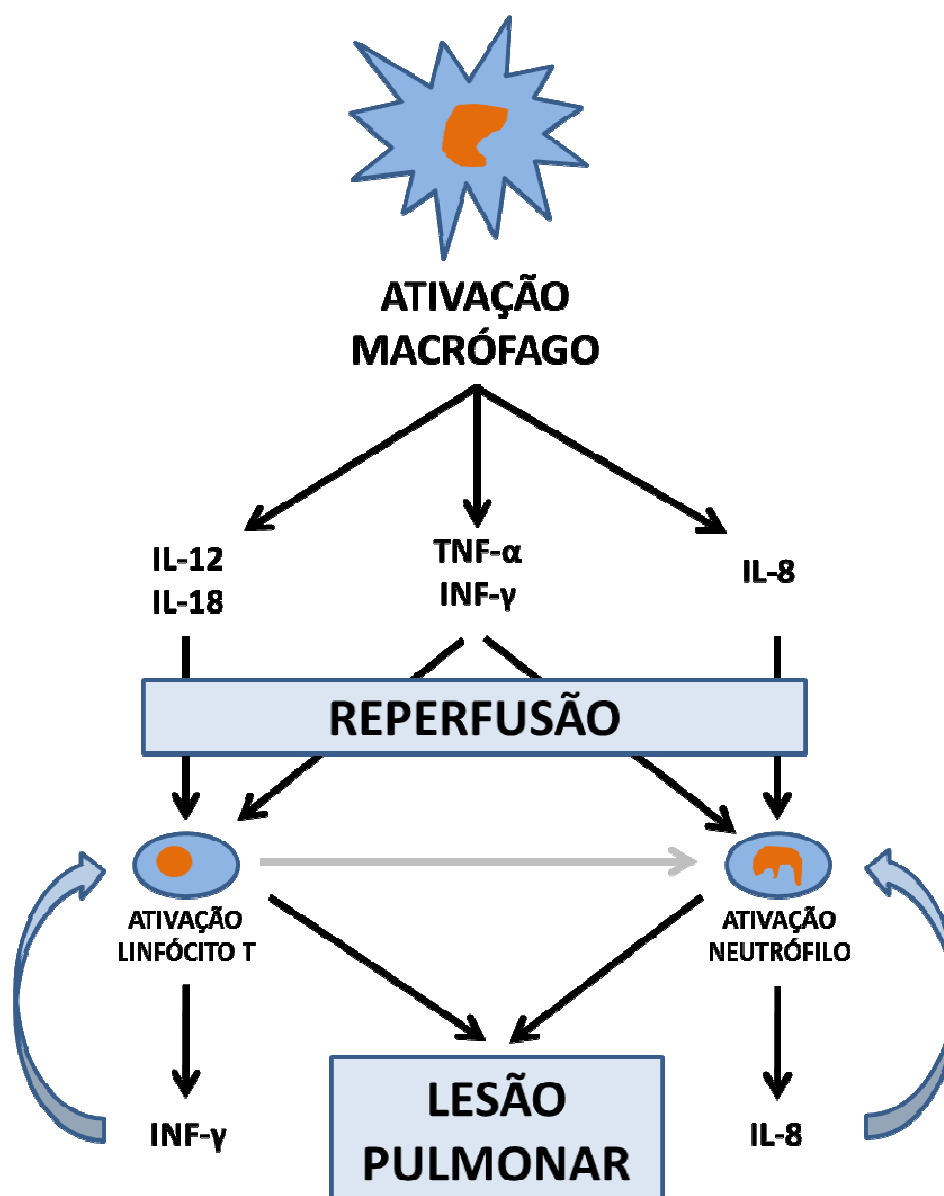


Figura 9. Os macrófagos do doador são ativados pela isquemia e liberam citocinas inflamatórias durante a fase precoce, as quais ativam os neutrófilos e linfócitos T do receptor que irão iniciar a fase tardia da lesão de isquemia-reperfusão. Modificado de de Perrot et al. (de Perrot et al., 2003)

O macrófago alveolar produz uma grande quantidade de citocinas e fatores pró-coagulantes em resposta ao estresse oxidativo. Em modelo de IR foi demonstrado a importância do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (INF- γ) e a proteína-1 quimioatrativa de macrófago

(equivalente a IL-8 humana) na fase precoce da reperfusão do enxerto em ratos (Eppinger et al., 1997).

Os linfócitos desempenham importante papel na lesão de IR. O pulmão do doador contém grande número macrófagos e linfócitos ativado representados por células T e *natural killer* que são responsáveis por reação imunológica do tipo enxerto-hospedeiro, como também por efeitos imunomoduladores benéficos (Richter et al., 1994). Em modelo de transplante pulmonar em ratos foi observado que os linfócitos T CD4 são mediadores da lesão de IR, infiltrando o enxerto uma hora após a reperfusão e aumentando a produção de INF- γ , além disso, foi sugerido que este efeito independe do recrutamento e ativação de neutrófilos (de Perrot et al., 2003).

Os neutrófilos têm a característica de progressivamente infiltrar o pulmão transplantado durante as primeiras 24 horas após a reperfusão (Adoumie et al., 1992). Embora tenham importante papel na fase tardia da lesão de reperfusão, seu papel na fase precoce é menos expressivo. Deeb e cols. demonstraram que a lesão de reperfusão nas primeiras quatro horas independe da presença dos neutrófilos, sendo importante o papel dos macrófagos nessa fase, no entanto, após esse período os neutrófilos são os principais mediadores (Deeb et al., 1990, Steimle et al., 1992) .

2.8. Apoptose e lesão de isquemia-reperfusão pulmonar

Diferente do que ocorre com a necrose, a apoptose ou morte celular programada não está presente durante a isquemia, porém ocorre um pico de

sua expressão durante a reperfusão (Stammberger et al., 2000). A indução de apoptose ocorre pela ativação e indução de duas vias. A via intrínseca é dependente da mitocôndria, sendo ativada pelas ERO, enquanto a via extrínseca é dependente de moléculas inflamatórias como o TNF- α , entretanto, ao ativar a produção de ERO pela via NADPH oxidase o TNF- α contribuiria também com a via intrínseca (Rossi et al., 2003). Ambas as vias promovem a ativação de caspases, proteases responsáveis pela clivagem de substratos celulares específicos que resultam em alterações na conformação celular, alterações na membrana e fragmentação do DNA e conseqüente morte celular (Chang et al., 2000). A via intrínseca é ativada na fase precoce da reperfusão, já a via extrínseca pode ser ativada até algumas horas após a reperfusão pulmonar (Kuwano et al., 2000).

2.8.1. Caspases

São características da apoptose: a condensação da cromatina, exposição da fosfatidilserina à superfície da célula, encolhimento citoplasmático, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA (van de Schepop et al., 1996). A apoptose é um processo dependente de energia, diferentemente da necrose que também ocorre na ausência de ATP (McClintock et al., 2002). A apoptose é regulada por uma cascata de proteínas chamadas Caspases, sendo essas as proteínas executoras da apoptose e estão presentes em todas as células. Após a clivagem, Caspases tornam-se ativos e iniciam vias que levam à apoptose (Greijer et al., 2004).

A via de sinalização que leva à morte celular programada é mantida por reguladores positivos e negativos, esse equilíbrio entre tais fatores decide se a célula sofre apoptose ou se sobrevive. As proteínas que podem alterar-se para a sobrevivência são as proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, enquanto que as proteínas proapoptóticas Bax, Bad, Bak e Bis induzem à morte celular programada (Gross et al., 1999).

Um importante regulador de apoptose após a lesão do DNA é a proteína p53, que pode induzir a Bax e Bak, que regula a liberação de citocromo C da mitocôndria, iniciando assim a cascata que conduz à apoptose (Wei et al., 2001). O citocromo C liga-se ao fator de ativação de protease apoptótica 1 (Apaf-1) ativando a Caspase 9, que por sua vez cliva as Caspases 3 e 6 (Li et al., 1997, Nicholson et al., 1997) levando à morte celular.

3. Justificativa

O transplante pulmonar pode apresentar diversas complicações no período pós-operatório precoce, como lesão de isquemia/reperfusão, atelectasia, rejeição e infecção. Avanços nas técnicas de preservação pulmonar têm reduzido a incidência de disfunção precoce do enxerto, entretanto os mecanismos que envolvem a lesão de reperfusão ainda são responsáveis por cerca de 20% da mortalidade após o transplante pulmonar.

Atualmente, não existem medicamentos ou substâncias que prolonguem o tempo de isquemia de um órgão com a devida manutenção de sua viabilidade. Por isto existe grande interesse na descoberta de novas substâncias e no estudo de seus mecanismos com o objetivo de impedir ou diminuir os danos da lesão de isquemia e reperfusão, e assim, reduzir as complicações decorrentes deste processo.

A N-acetilcisteína é um mucolítico que teve suas primeiras aplicações no tratamento de doenças congestivas e obstrutivas pulmonares associadas à hipersecreção. Ela apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, e, portanto, torna-se uma intervenção promissora na preservação pulmonar na lesão de isquemia e reperfusão.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito protetor celular da N-Acetilcisteína (NAC) em pulmões de ratos submetidos ao modelo experimental de lesão de isquemia e reperfusão pulmonar.

4.2 Objetivos específicos

- Verificar as alterações fisiológicas (gasométricas e hemodinâmicas) em ratos submetidos a modelo de isquemia e reperfusão pulmonar;
- Avaliar o estresse oxidativo no tecido pulmonar após a reperfusão pulmonar de animais tratados ou não tratados com NAC;
- Avaliar a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e Nitrotirosina no tecido pulmonar de animais tratados e não tratados com NAC.
- Avaliar a presença de agregação neutrofílica, bem como a apoptose através da expressão da Caspase 3 no tecido pulmonar de animais tratados e não tratados com NAC
- Avaliar e quantificar a agregação neutrofílica em modelo de isquemia e reperfusão pulmonar de animais tratados ou não tratados com NAC
- Avaliar a expressão do fator de transcrição NF- κ B, através de sua subunidade p65, do seu inibidor I κ B- α , do TNF- α e IL-1 β no tecido pulmonar de animais tratados e não tratados com NAC.
- Avaliar as alterações histopatológicas resultantes do tratamento com NAC em modelo de isquemia e reperfusão.
- Verificar se diferentes momentos de administração da NAC tem influência sobre a resposta inflamatória após a reperfusão pulmonar

5. Artigo Científico – Revista Mediators of inflammation

TITLE PAGE

N-acetylcysteine (NAC) administration decreases lung injury in an experimental model of ischemia and reperfusion

Luiz Felipe Forgiarini^{1,2}; Luiz Alberto Forgiarini Junior^{1,3}; Mariel Barbachan e Silva¹; Darlan Pase da Rosa^{1,4}; Rodrigo Mariano¹; Artur de Oliveira Paludo¹; Cristiano Feijó Andrade^{1,2,5}.

1 – Laboratory of Airways and Lung, Experimental Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

2 – Post graduation Program in Pneumology Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS);

3 – Methodist University Center – IPA;

4 – Cenecist Faculty of Bento Gonçalves-RS, Brazil;

5 - Departament of Thoracic Surgery Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

Correspondence Author

Dr. Cristiano Feijó Andrade

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Thoracic Surgery - Brazil

tel. 55 51 33598839

cristianofa@gmail.com

ABSTRACT

Objective - To verify the effects of N-acetylcysteine (NAC) administered before and after ischemia in an animal model of lung ischemia-reperfusion injury.

Methods – Twenty-four Wistar rats were subjected to an experimental model of selective left pulmonary hilum clamping for 45 minutes followed by 2 hours of reperfusion. The animals were divided into four groups: SHAM, ischemia-reperfusion (IR), N-acetylcysteine pre ischemia (NAC-Pre) and NAC post ischemia (NAC-Post) groups. We recorded the hemodynamic parameters, blood gas analysis and histology. We measured the iNOS, nitrotyrosine, cleaved caspase 3, NF- κ B (sub-unit phospho p65), I κ B- α , TNF- α and IL-1 β expression. Lipid peroxidation was assessed by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay and the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD). Neutrophil infiltration was assayed by myeloperoxidase activity.

Results - No significant differences were observed in hemodynamic parameters and blood gas analysis among the groups. Lipid peroxidation was significantly higher in IR and NAC-Pre groups ($p < 0.01$). SOD activity had no difference among the groups. The expressions of NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , Nitrotyrosine and Cleaved caspase 3 were significantly higher in the IR group when compared to SHAM and NAC groups ($p < 0.01$). NAC-Pre group showed a significant higher expression of these proteins when compared to SHAM and NAC-Post groups. After reperfusion the expression of iNOS increased almost uniformly in all groups when compared to SHAM group ($p < 0.01$). The histological analysis showed less inflammatory cells in the NAC groups.

Conclusion - The intravenous administration of NAC demonstrated protective properties against lung IR injury. Its use reduces the damage produced by oxidative stress, has anti-inflammatory activity and prevents apoptosis. Furthermore, the use of NAC just after reperfusion potentiates its protective effects showing to be the more effective period for its administration.

INTRODUCTION

Ischemia-reperfusion (IR)-induced acute lung injury is the major cause of early morbidity and mortality following lung transplantation (1-3). The IR injury is exacerbated by the induction of proinflammatory signaling pathways that target the activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) (4, 5). NF- κ B is an important rapid-response transcription factor that is critical for the regulation of apoptosis and the expression of the inflammatory mediators that significantly contribute to the pathogenesis of an IR injury in different settings (6, 7).

N-acetylcysteine is not simply an antioxidant drug. It acts as a glutathione precursor, a chemical reductant of oxidized thiols, scavenger of radical oxygen species, and as a vasodilator which improves microcirculation by restoring the decreased activity of endothelium-derived relaxing factor and may have antiaggregan features (8, 9). NAC has been used successfully in the treatment of chronic bronchitis and fulminant liver failure after acetaminophen overdose (10, 11).

In experimental conditions NAC protects the lung against reactive oxygen species in heart failure after induced warm ischemia and reperfusion (12, 13). There is a growing evidence regarding its beneficial effects on ameliorating lung ischemia-reperfusion injury (14). However its role in reducing lung damage after reperfusion has not been addressed yet. Therefore we studied the influence of the time of NAC administration and its anti-inflammatory effects in a model of lung ischemia followed by reperfusion.

MATERIAL AND METHODS

Animal Model

Animals weighing 250 – 300g were handled in accordance with the Animal Welfare Act and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication 86-23, revised 1996). The Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved the experimental protocols.

Twenty-four rats were randomized into 4 groups (n = 6) according to the surgical procedure: the simulation group (SHAM), the ischemia-reperfusion group (IR), N-Acetylcysteine before ischemia (NAC-Pre) and N- Acetylcysteine after ischemia (NAC-Post).

The animals were anesthetized with Isoflurane (50 ml/hour with 0.5L oxygen). The anesthesia was maintained with 7-10 ml/hour isoflurane. The rats were mechanically ventilated using a volumetric ventilator (Harvard Rodent Ventilator, model 683; Harvard Apparatus Co. Millis, MA, USA). The ventilator was set to a tidal volume of 8 ml/kg of body weight, a respiratory rate of 70-80 breaths/min, a fraction of inspired oxygen of 0.2 (room air) and a positive end expiratory pressure of 2 cm H₂O. The animals were submitted to a left thoracotomy, in the fifth intercostal space. Immediately preceding the selective arterial clamping, lung expansion was achieved through the occlusion of the expiratory valve for three inspiratory cycles to avoid atelectasis. During the clamping of the pulmonary hilum, the animal was maintained on mechanical ventilation.

The mean systemic arterial pressure (MAP) was measured via cannulation of the right carotid artery (Sirecust 730; Siemens, Solna, Sweden).

The same cannula was used to collect blood samples for arterial blood gas analysis (Blood Gas Analyzer, Siemens Bayer 865, Siemens, Solna, Sweden). NAC was infused through the jugular vein. The mean systemic arterial pressure and the arterial blood gases were measured before the thoracotomy (baseline) for all groups and 2 hours after reperfusion in the IR and the IR/NAC groups.

In the SHAM group, following tracheotomy and cannulation of the right carotid artery and jugular vein, the animals were subjected to a left thoracotomy in the fifth intercostal space, the pulmonary ligament was sectioned, and, subsequently, the left pulmonary hilum was isolated. In the SHAM group, the data from the MAP and arterial blood gas analysis were collected before the thoracotomy and 2 hours after a hilum manipulation.

In the IR group, the same procedure was performed as described above. Afterwards, we clamped the left pulmonary hilum using a vascular microclip (Vicca Neuroclip, Cachoeirinha, RS, Brazil) for 45 minutes. In the NAC groups, we performed the same surgical procedure as previously described for the IR group. Five minutes before clamp, we administered 50 mg/kg of N-acetylcysteine (NAC-Pre group), in the NAC-Post group we administered the same dose 5 minutes after release the clamp. After a 120 minutes period of reperfusion (IR and NAC groups) or observation (SHAM), the animals were euthanized. The left lung was removed and either stored at -80°C or in 10% formalin.

The lungs were cut and divided for biochemical and protein analyses. For analysis of oxidative stress, 100mg of tissue was added to 0.9mL of buffer (140mM KCl, 20mM phosphate, pH 7.4) and homogenized with a micropestle in microtubes. After centrifugation at 2150.4g for 10 minutes in a refrigerated

centrifuge (4°C), the supernatant was stored at -80°C for further analysis. For western blotting, a nuclear extraction protocol was used. Briefly, 100mg of tissue was added to 0.6ml of lysis buffer (25mM HEPES, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 0.1ml NaCl, 25mM NaF, 1mM sodium orthovanadate, and a protease inhibitor cocktail) and homogenized with a micropestle in microtubes. After centrifugation at 15,000g for 10 minutes at 4°C, the supernatant was stored at -80°C for further analysis.

Oxidative Stress

Proteins

The protein concentration in the homogenate was measured spectrophotometrically at 595nm using the Bradford method (15). The values are expressed in mg/ml and were used in the calculations for the TBARS, Superoxide Dismutase and Western Blot analysis.

Assessment of Lipid Peroxidation

The TBARS technique consists of heating the homogenate with thiobarbituric acid to produce a colored product that is subsequently measured at 535nm using a spectrophotometer. The change in color is due to the presence of malondialdehyde and other substances produced from lipid peroxidation in the biological material. Briefly, 0.25ml of 10% trichloroacetic acid (TCA), 0.10ml of

homogenate, 0.067ml of 0.67% thiobarbituric acid (TBA), and 0.033ml of distilled water were added to a tube, stirred, and then heated at 100°C. After the tubes cooled, 0.20ml of n-butyl alcohol was added to extract the pigment. The tubes were then stirred and centrifuged for 10 minutes at 1110g. A 0.20ml aliquot of the supernatant was added to a 96-well plate. The absorbance of the samples was quantified on a spectrophotometer at 535nm. The TBARS concentration was expressed in nmol/mg protein (16).

Determination of Superoxide Dismutase (SOD)

The technique used to measure SOD was based on the level of inhibition caused by the reaction of the enzyme with $O_2^{\cdot -}$. We used adrenaline in an alkaline medium to produce adrenochrome and $O_2^{\cdot -}$ (17).

In a 96-well plate, we measured SOD activity in the reaction medium (50mM glycine-NaOH, pH 10) and three samples containing different concentrations of homogenate. After addition of 10.5 μ l epinephrine (60mM, pH 2.0), the reaction was monitored for 2min at 480nm. The enzymatic activity was expressed in units SOD/mg protein.

Western Blots

A total of 50mg of protein was added to a buffer (60% glycerol, 2M Tris, SDS, and 10% Pyrroline 0.5%) and incubated for four minutes at 100°C. After electrophoresis was performed (18) on a 9–12% polyacrylamide gel, the protein was transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (19). The membrane was washed with PBS contained 0.5% Tween 20 and then incubated in a blocking solution (5% skim milk powder and 0.5% Tween 20 in cold PBS) for 30 minutes. After washing, the membrane was incubated overnight at 4°C with the primary antibody. Next, the membrane was washed and incubated in the secondary antibody (HRP) for two hours at room temperature. After another wash, the protein was visualized using chemiluminescent detection (Chemiluminescent HRP Substrate), film, and a transilluminator (L-Pix Chemi molecular imaging - Loccus Biotechnology). β -actin was used as a loading control. The results were quantified using LabImage 1D (Loccus Biotechnology) and are expressed as arbitrary units.

Mieloperoxydase assay

Myeloperoxidase (MPO) activity was measured according to Worthington enzyme manual (20). Whole ear tissue was homogenized in phosphate buffer (50 mmol/L) at pH = 6 containing 0.5 % hexadecyl trimethylammonium bromide (HTAB) (100 mg tissue/mL buffer) using a homogenizer (Ultra-turax T-25). The samples were sonicated for 10 s, freezing and thawing at 20 to 30 °C three times. After that, the samples were centrifuged at 12 000 r/min for 25 min at 4

°C and supernatant was used for MPO determination. In brief, 250 μ L of sample was mixed with 625 μ L of phosphate buffer (50 mmol/L, pH = 6) containing 0.167 mg/mL O-dianisidine dihydrochloride and 125 μ L hydrogen peroxide (0.0005 %). The changes in absorbance at 460 nm were measured with spectrophotometer for two minutes. MPO activity was expressed as units/g of tissue (U/g tissue), one unit being defined as the degradation of 1 μ mol of peroxide per minute at 25°C.

Lung Histology

The lung tissue specimens were fixed in formalin and dehydrated, cleared, and embedded in paraffin. The specimens were cut into 5- μ m serial sections and stained with hematoxylin-eosin.

Statistical Analysis

The groups were compared using an analysis of variance (ANOVA) followed by a *post hoc* Tukey test was performed using SPSS version 18.0 (Statistical Package for Social Science). Two-way ANOVA was performed for blood gas analysis and PAM. The results are represented as the mean \pm standard deviation. The statistical significance level was set as $p < 0.05$.

RESULTS

There were no significant differences among the groups in terms of the blood gas analysis and the mean arterial pressure (Table 1). The quantity of

lipid peroxidation products at the end of reperfusion significantly increased in the IR and NAC-Pre groups ($p < 0.01$) when compared to SHAM. NAC-Post although slight higher than SHAM group did not show any significant difference regarding TBARS quantification. However, when compared to IR group there was a significant difference ($p < 0.05$) (Figure 1). The activity of superoxide dismutase did not change significantly among the groups (Figure 1).

Both phosphorylated p65 subunit of NF- κ B and phosphorylated portion of I κ B- α significantly increased in the IR and NAC-Pre groups when compared to SHAM ($p < 0.001$) and NAC-Post groups ($p < 0.01$) (Figure 2). Phosphorylated p65 subunit and I κ B- α in the NAC-Pre group was also statistically lower when compared to IR group ($p < 0.01$). There was a significant increase in TNF- α , IL-1 β and Cleaved Caspase 3 expression in the IR and NAC-Pre groups ($p < 0.001$) when compared to SHAM and NAC-Post groups (Figure 3). Although TNF- α , IL-1 β and Cleaved Caspase 3 expression increased in the NAC-Pre group there was a significant lower expression when compared to the IR group ($p < 0.05$).

After reperfusion the expression of iNOS increased almost uniformly in all groups when compared to SHAM group ($p < 0.01$). The nitrotyrosine expression increased in IR and NAC-Pre group when compared to SHAM and NAC-Post groups ($p < 0.001$) (Figure 4). Nitrotyrosine in the NAC-Pre group was also statistically lower when compared to IR group ($p < 0.01$).

Neutrophil infiltration by Myeloperoxidase assay showed a significant increased in IR and NAC-Pre groups ($p < 0.01$) when compared to SHAM and NAC-Post groups. NAC-Pre group had a significant MPO lower activity when compared to the IR group ($p < 0.05$).

The histopathological analysis of the IR group lung tissues showed changes in lung morphology characterized by cellular infiltrates, a thickening of the alveolar septae and atelectasis, which were attenuated in both NAC groups, while SHAM group did not demonstrated alterations in the lung parenchyma (Figure 5).

DISCUSSION

Our results showed that the utilization of NAC attenuates lung injury and prevents the release of inflammatory and oxidative mediators without sizeable changes in gas exchange. The use of NAC after the end of the ischemic period proved to be more effective than its administration at the beginning of the ischemic period, showing better lung protection against the deleterious effects of the ischemia-reperfusion injury.

Studies using both animals and humans have investigated the effects of pharmacological interventions that attempt to reduce the IR injuries (21-25). Our IR model reproduces many of the features described by Chiang et al. and Lu et al., including inflammatory responses and structural lung damage (21-24).

In our study, there were no significant changes related to mean arterial pressure and blood gas analyses, demonstrating that the use of NAC does not compromises neither pulmonary function nor hemodynamics.

N-acetylcysteine is a thiolic compound that contains a sulfhydryl group donor, serving as a precursor of glutathione synthesis and inhibits the formation of ROS (26). Based on the results of the TBARS quantification analysis, NAC showed no increase in lipid peroxidation when used after the end of the observation period. This result demonstrates a protective effect of NAC against

oxidative stress after reperfusion. Similar results were observed by Zhang et al (27) who demonstrated a significant decrease of lipid peroxidation using NAC in similar model of IR. On the other hand, SOD activity did not alter using NAC. This drug is a potential exogenous antioxidant, and prevent ROS formation in others diseases (26). Additional protective effects of N-acetylcysteine may lie within the ability of this compound to reduce oxyradical-related oxidant processes by either directly interfering with the oxidants, or up-regulating antioxidant systems such as superoxide dismutase (28) or enhancing the catalytic activity of glutathione peroxidase (29).

NAC was able to reduce the phosphorylation of p-65, I κ B- α and consequently decrease the apoptotic and inflammatory responses. NAC-Post group exhibited a non-activation of these proteins and NAC-Pre group demonstrated a lower expression when compared to IR group. Similar findings were described by Erne et al using a model of lung transplantation where NAC was able to decrease NF- κ B activation (30).

Ischemia-reperfusion activates different pathways of cell death, which could be categorized as necrosis, apoptosis or autophagy-associated cell death (31). We found an increased expression of cleaved caspase 3 in the IR group. On the other hand, both NAC groups showed a lower expression of this protein, which was similar than the SHAM group, suggesting cellular protection after reperfusion (27). ROS can also change cell membrane components, which may induce cellular apoptosis. The apoptotic protective activity of NAC in our study could be a result of intracellular blockade of stress-activated kinases (32). The transcription factor NF- κ B may modulate apoptosis during IR (33) and a non-

activation of this protein in both NAC groups could explain the protection against apoptosis.

NAC restores stocks of reduced glutathione, stimulates vasodilation by replacement of nitric oxide increasing sulfhydryl and promotes reduction of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (34). We demonstrated that both NAC groups had lower expression of TNF- α and IL-1 β than IR group, showing that they are able to reduce the inflammatory activity after reperfusion, with a more pronounced effect when administered after the end of the ischemic period.

In our study, we observed that the iNOS expression was similar in IR and both NAC groups. Since, NAC was supposed to promote an induction of gene transcription of iNOS through the increase of glutathione levels, we expected a considerable higher expression of iNOS in both NAC groups (34)(35). However, NAC did not potentiate the effects of IR injury using this model. Additionally, the lower expression of Nitrotyrosine in both NAC groups shows the antioxidant and anti-inflammatory NAC properties.

In conclusion, the intravenous administration of NAC demonstrated protective properties against lung IR injury in our experimental model. Its use reduces the damage produced by oxidative stress, has anti-inflammatory activity and prevents apoptosis. Furthermore, the use of NAC just after reperfusion potentiates its protective effects showing to be the more effective period for its administration.

Table 1. The effects of ischemia on the mean arterial pressure and blood gas analyses. There were no significant difference among the groups. NS – non significant.

	MAP		p	PaO ₂		p	PaCO ₂		p
	Baseline	Final		Baseline	Final		Baseline	Final	
SHAM	153.8±31.2	139.9±26.9	NS	271.6±61.7	263.7±87.3	NS	52.3±10.1	54.3±17.1	NS
IR	133.3±25.5	119.08±30.8		264.6±75.3	257.9±68.3		45.5±8.5	46.9±9.2	
NAC Pre	154.7±56.7	119.3±13.5		302.7±62.7	316.1±51.8		48.6±15.6	48.1±19.1	
NAC Post	146.7±32.8	129.8±14.6		266.2±74.1	234.5±52.2		49.5±23.1	49.3±18.3	

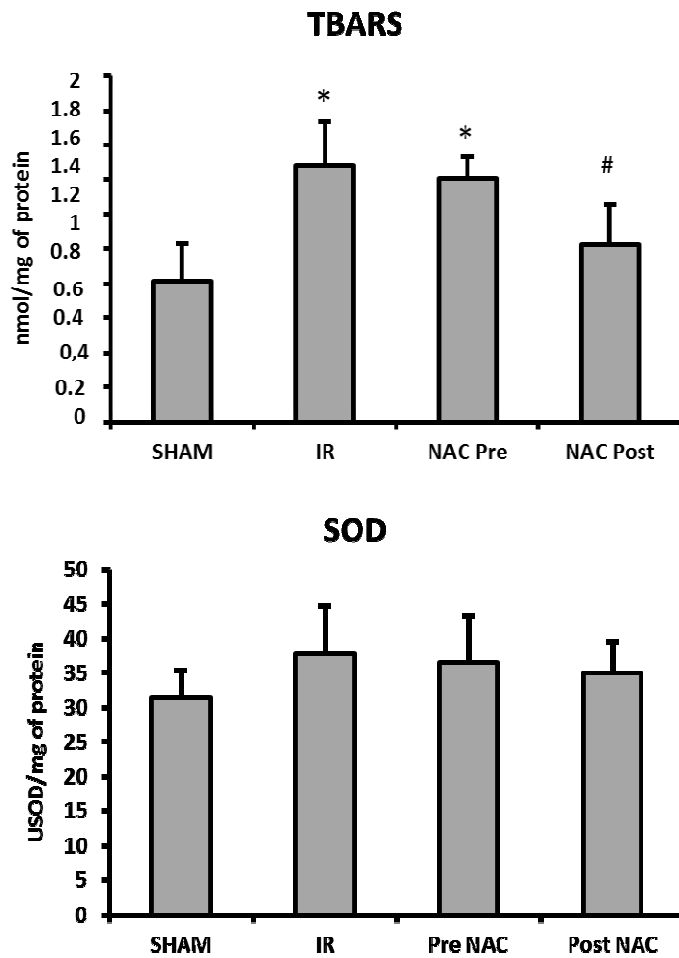


Figure 1. Pulmonary lipid peroxidation at the end of reperfusion using TBARS assay were demonstrates a significant increase in IR and NAC-Pre groups (* $p < 0.01$) when compared to SHAM group. NAC-Post Group showed lower increase in lipid peroxidation when compared the IR group ($\#p < 0.05$). SOD activity did show any difference among the groups.

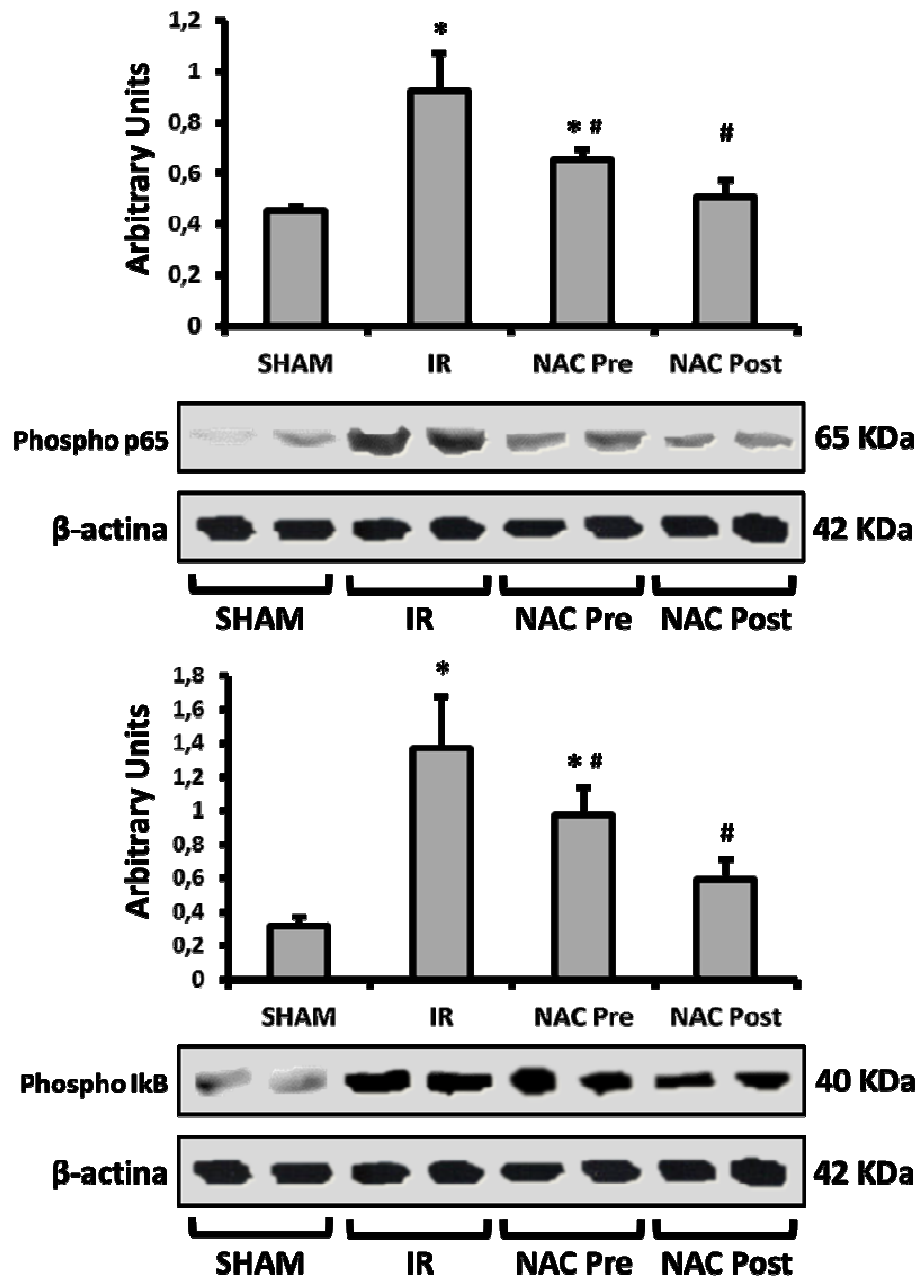


Figure 2. The expression of phosphorylated p65 and IκB in lung tissues. An overexpression of p65 and IκB were found in the IR and NAC-Pre groups (*p<0.001) when compared to SHAM group. NAC-Pre and NAC-Post groups showed a lower expression when compared to IR group (# p<0.01).

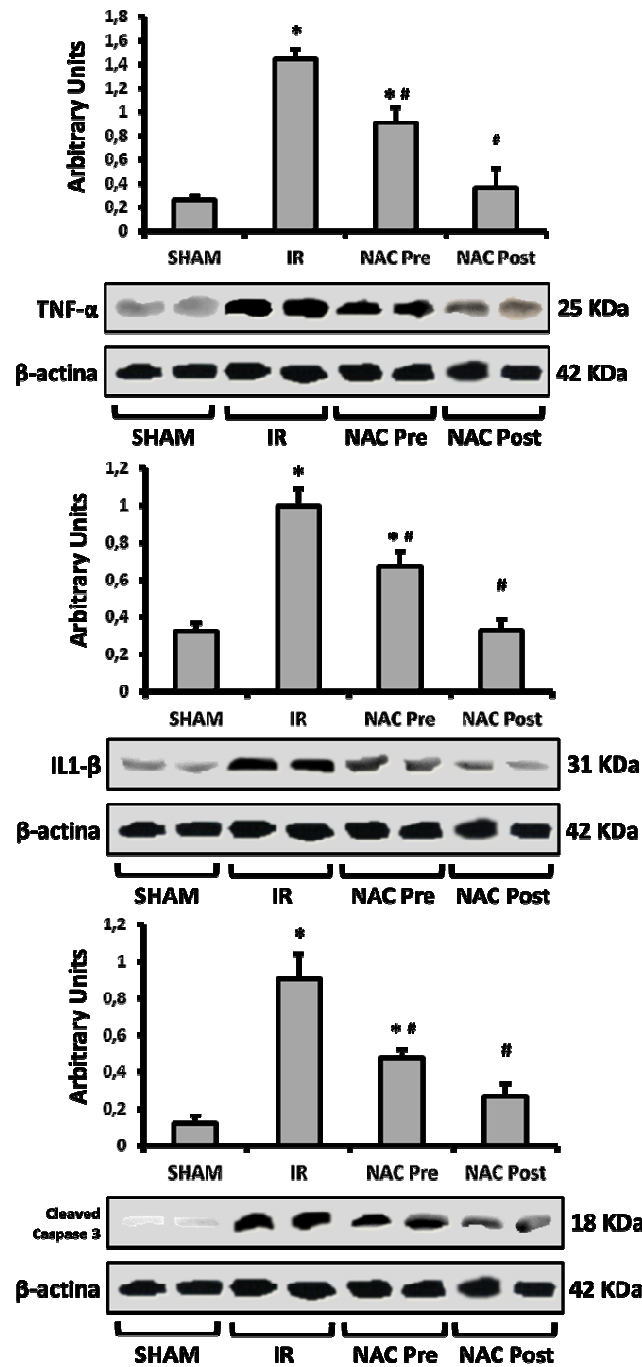


Figure 3. Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α), Interleukin-1 Beta (IL-1 β) and Cleaved Caspase 3 expression in lung tissues. The IR and NAC-Pre groups exhibited increased expression when compared to SHAM and NAC-Post groups (* $p < 0.01$). NAC-Pre and NAC-Post groups presented a significantly reduced expression after reperfusion (# $p < 0.01$) when compared the IR group.

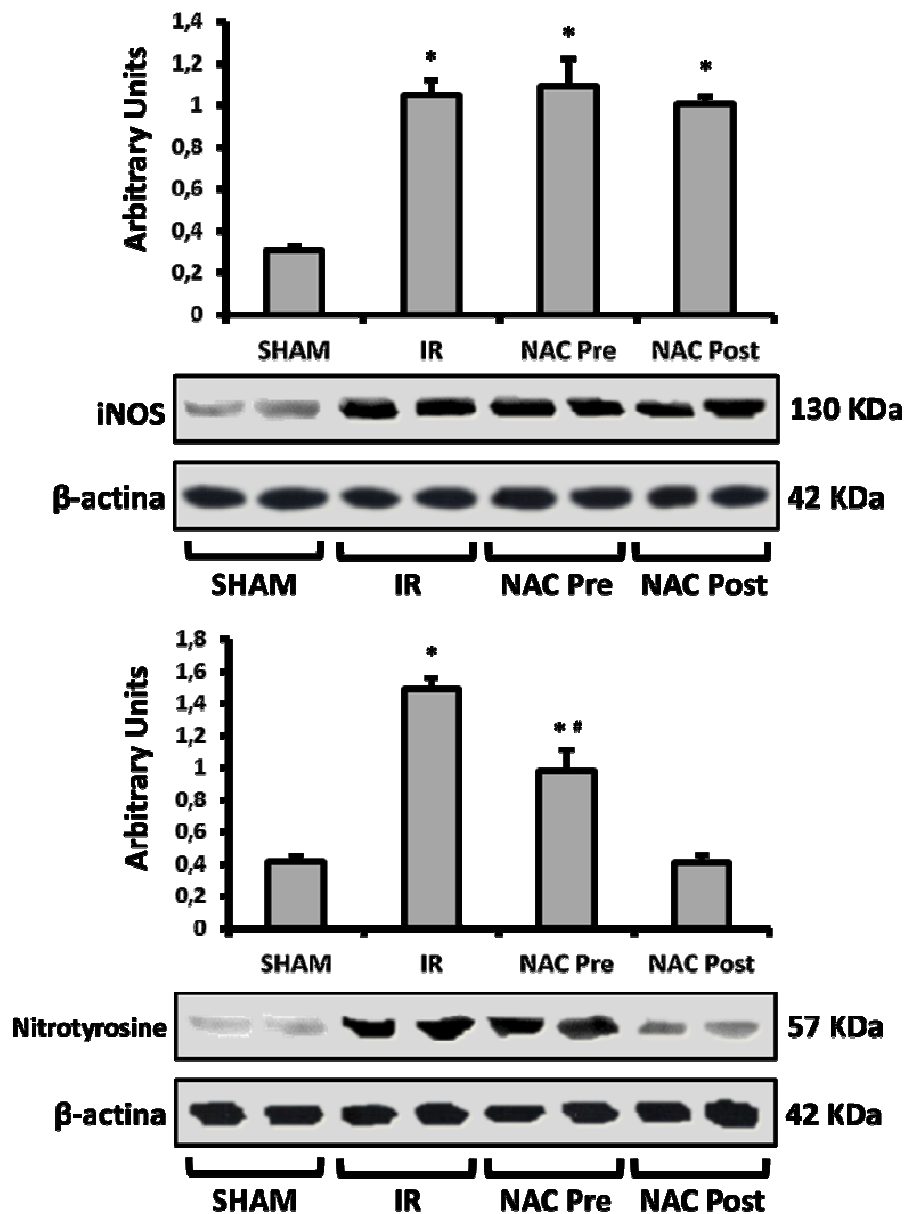


Figure 4. The effects of NAC and IR on iNOS and Nitrotyrosine expression. iNOS expression demonstrated a significant increase in the IR and both NAC groups ($p < 0.001$) when compared to the SHAM group. There was a significant increase in the Nitrotyrosine expression after reperfusion in the IR and NAC-Pre groups ($p < 0.001$) when compared with SHAM and NAC-Post groups. NAC-Pre group demonstrates a significant decreased ($^{\#}p < 0.01$) when compared to the IR group.

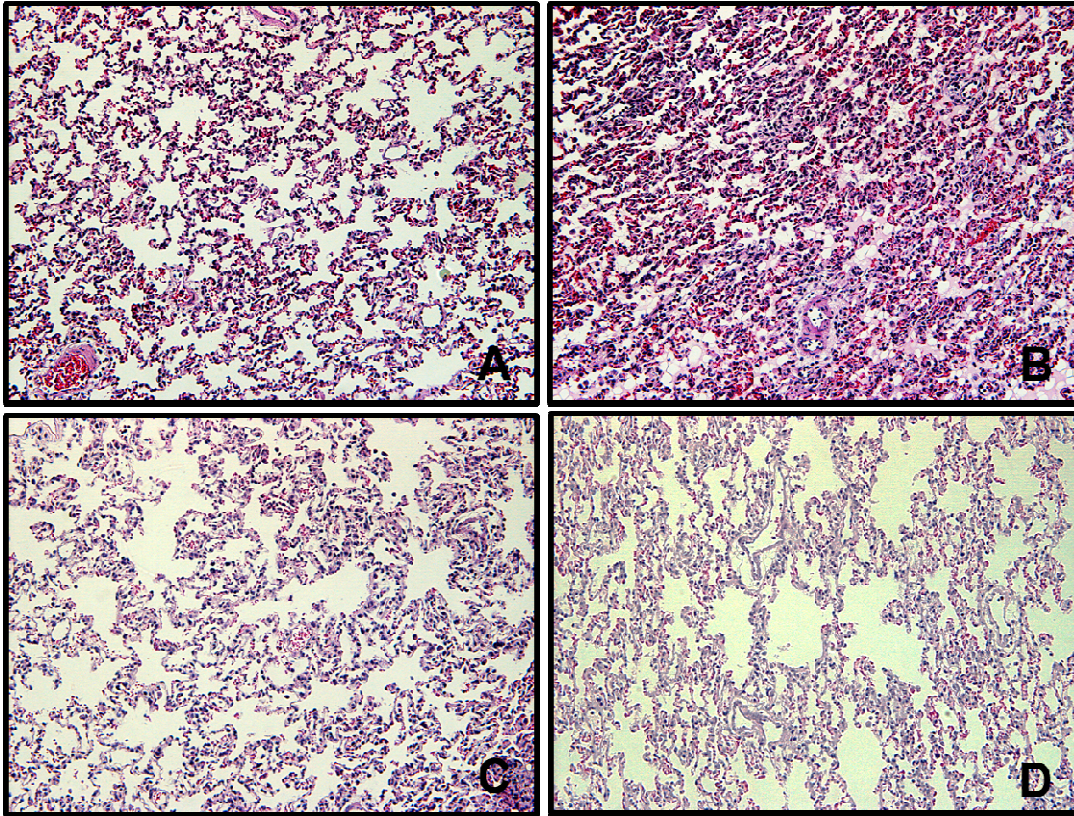


Figure 5. Histopathological analysis (magnification 200x) showed cellular infiltrates, thickening of the alveolar septae and atelectasis in the IR group. The NAC-Post group showed less evident histological features than IR group. A – SHAM group; B – IR group; C – NAC-Pre group; D – NAC-Post group.

REFERENCES

1. Bharat A, Kuo E, Steward N, Aloush A, Hachem R, Trulock EP, et al. Immunological link between primary graft dysfunction and chronic lung allograft rejection. *The Annals of thoracic surgery*. 2008 Jul;86(1):189-95; discussion 96-7.
2. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003 Feb 15;167(4):490-511.
3. Huang HJ, Yusef RD, Meyers BF, Walter MJ, Mohanakumar T, Patterson GA, et al. Late primary graft dysfunction after lung transplantation and bronchiolitis obliterans syndrome. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008 Nov;8(11):2454-62.
4. Ng CS, Wan S, Yim AP. Pulmonary ischaemia-reperfusion injury: role of apoptosis. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2005 Feb;25(2):356-63.
5. Ross SD, Kron IL, Gangemi JJ, Shockey KS, Stoler M, Kern JA, et al. Attenuation of lung reperfusion injury after transplantation using an inhibitor of nuclear factor-kappaB. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2000 Sep;279(3):L528-36.
6. Hirschl RB, Tooley R, Parent A, Johnson K, Bartlett RH. Evaluation of gas exchange, pulmonary compliance, and lung injury during total and partial liquid ventilation in the acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine*. 1996 Jun;24(6):1001-8.
7. Haeberle HA, Nesti F, Dieterich HJ, Gatalica Z, Garofalo RP. Perflubron reduces lung inflammation in respiratory syncytial virus infection by inhibiting

chemokine expression and nuclear factor-kappa B activation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002 May 15;165(10):1433-8.

8. Tredger JM. N-acetylcysteine: not simply a glutathione precursor. *Transplantation*. 2000 Mar 15;69(5):703-4.

9. Arstall MA, Yang J, Stafford I, Betts WH, Horowitz JD. N-acetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction. Safety and biochemical effects. *Circulation*. 1995 Nov 15;92(10):2855-62.

10. Boman G, Backer U, Larsson S, Melander B, Wahlander L. Oral acetylcysteine reduces exacerbation rate in chronic bronchitis: report of a trial organized by the Swedish Society for Pulmonary Diseases. *European journal of respiratory diseases*. 1983 Aug;64(6):405-15.

11. Keays R, Harrison PM, Wendon JA, Forbes A, Gove C, Alexander GJ, et al. Intravenous acetylcysteine in paracetamol induced fulminant hepatic failure: a prospective controlled trial. *Bmj*. 1991 Oct 26;303(6809):1026-9.

12. Bernard GR, Lucht WD, Niedermeyer ME, Snapper JR, Ogletree ML, Brigham KL. Effect of N-acetylcysteine on the pulmonary response to endotoxin in the awake sheep and upon in vitro granulocyte function. *The Journal of clinical investigation*. 1984 Jun;73(6):1772-84.

13. Qiu Y, Bernier M, Hearse DJ. The influence of N-acetylcysteine on cardiac function and rhythm disorders during ischemia and reperfusion. *Cardioscience*. 1990 Mar;1(1):65-74.

14. Weinbroum AA, Rudick V, Ben-Abraham R, Karchevski E. N-acetyl-L-cysteine for preventing lung reperfusion injury after liver ischemia-reperfusion: a possible dual protective mechanism in a dose-response study. *Transplantation*. 2000 Mar 15;69(5):853-9.

15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976 May 7;72:248-54.
16. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*. 1978;52:302-10.
17. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*. 1972 May 25;247(10):3170-5.
18. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
19. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979 Sep;76(9):4350-4.
20. Freehold. *Worthington enzyme manual*1972. p. 43-5.
21. Chiang CH, Pai HI, Liu SL. Ventilator-induced lung injury (VILI) promotes ischemia/reperfusion lung injury (I/R) and NF-kappaB antibody attenuates both injuries. *Resuscitation*. 2008 Oct;79(1):147-54.
22. Forgiarini LA, Jr., Grun G, Kretzmann NA, de Munoz GA, de Almeida A, Forgiarini LF, et al. When is injury potentially reversible in a lung ischemia-reperfusion model? *The Journal of surgical research*. 2013 Jan;179(1):168-74.
23. Lau CL, Zhao Y, Kim J, Kron IL, Sharma A, Yang Z, et al. Enhanced fibrinolysis protects against lung ischemia-reperfusion injury. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2009 May;137(5):1241-8.

24. Lu HL, Chiang CH. Combined therapy of pentastarch, dexamethasone, and dibutyril-cAMP or beta 2-agonist attenuates ischaemia/reperfusion injury of rat lung. *Injury*. 2008 Sep;39(9):1062-70.
25. Nakano Y, Kondo T, Matsuo R, Murata S, Fukunaga K, Ohkohchi N. Prevention of leukocyte activation by the neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, in the hepatic microcirculation after ischemia-reperfusion. *The Journal of surgical research*. 2009 Aug;155(2):311-7.
26. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free radical biology & medicine*. 1989;6(6):593-7.
27. Zhang Z, Shen H, Qin HD, Xu Y, Ma MZ, Bao L, et al. [Protective effect of N-acetylcysteine against pneumocyte apoptosis during ischemia/reperfusion injury of lung in rats]. *Zhongguo wei zhong bing ji jiu yi xue = Chinese critical care medicine = Zhongguo weizhongbing jijiuyixue*. 2012 Feb;24(2):111-5.
28. Galley HF, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. *Free radical biology & medicine*. 1997;23(5):768-74.
29. Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. Tissue perfusion in critical illnesses. Antioxidant therapy. *Critical care medicine*. 1993 Feb;21(2 Suppl):S92-102.
30. Erne BV, Jungraithmayr W, Buschmann J, Arni S, Weder W, Inci I. Effect of N-Acetylcysteine on Acute Allograft Rejection After Rat Lung Transplantation. *The Annals of thoracic surgery*. 2013 Jan 10.
31. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *The New England journal of medicine*. 2009 Oct 15;361(16):1570-83.

32. Ozdulger A, Cinel I, Koksel O, Cinel L, Avlan D, Unlu A, et al. The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *Shock*. 2003 Apr;19(4):366-72.
33. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 Nov 28;103(48):18154-9.
34. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2003 Jan;60(1):6-20.
35. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1993 Oct;92(4):1866-74.

6. Conclusões

A administração sistêmica da NAC não apresenta efeito sobre os parâmetros hemodinâmicos e gasométricos, A NAC apresenta atividade antioxidante demonstrando efeito protetor ao pulmão após o período de isquemia.

A expressão da iNOS não sofreu qualquer efeito quando da administração de NAC, enquanto a Nitrotirosina reduziu nos animais tratados com NAC, principalmente naqueles em que foi administrada no final do período isquêmico, demonstrando-se como um importante fator de proteção ao estresse nitrativo.

A Caspase 3 e os fatores inflamatórios apresentaram menor expressão após a reperfusão nos animais tratados com NAC. Estes resultados demonstram que a NAC apresenta um papel protetor em relação a inflamação e morte celular após a reperfusão. Além disso, a NAC quando administrada após o término do período isquêmico potencializa este efeito protetor.

A administração da NAC não alterou o parênquima pulmonar, pois não demonstra que a sua utilização altera a morfologia das células ou aumento os danos ocasionados após a reperfusão.

7. Considerações finais

Verificamos que a administração endovenosa de N-acetilcisteína fornece proteção adicional aos pulmões quando submetidos a lesão de isquemia-reperfusão em modelo experimental de roedores. A NAC mostrou-se eficiente na redução da resposta inflamatória e apoptose, além de proteger os pulmões do estresse oxidativo pós reperfusão.

A utilização da NAC em dois diferentes tempos do período de isquemia mostrou uma significativa proteção pulmonar, porém quando administrada após o final do período isquêmico mostrou-se mais eficiente por reduzir ou inibir a expressão e/ou ativação de proteínas inflamatórias, além de apresentar uma melhor proteção contra a lipoperoxidação e menor alteração histológica no parênquima pulmonar.

Com isso, sugerimos a utilização da N-acetilcisteína no final do período isquêmico como uma substância adicional para a proteção pulmonar contra os efeitos deletérios resultantes da lesão de isquemia-reperfusão.

8. Referências bibliográficas

- Adoumie, R., C. Serrick, A. Giaid and H. Shennib (1992). "Early cellular events in the lung allograft." Ann Thorac Surg **54**(6): 1071-1076; discussion 1076-1077.
- Al-Mehdi, A. B., H. Shuman and A. B. Fisher (1997). "Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia." Am J Physiol **272**(2 Pt 1): L294-300.
- Albes, J. M., H. Brandes, M. K. Heinemann, A. Scheule and T. Wahlers (1997). "Potassium-reduced lung preservation solutions: a screening study." Eur Surg Res **29**(5): 327-338.
- Alho, H., J. S. Leinonen, M. Erhola, K. Lonrot and R. Aejmelaeus (1998). "Assay of antioxidant capacity of human plasma and CSF in aging and disease." Restor Neurol Neurosci **12**(2-3): 159-165.
- Alvarez, A., A. Salvatierra, R. Lama, J. Algar, F. Cerezo, F. Santos, J. C. Robles, C. Baamonde and J. L. Pujol (1999). "Preservation with a retrograde second flushing of Eurocollins in clinical lung transplantation." Transplant Proc **31**(1-2): 1088-1090.
- Andrade, C. (2001). Impacto da ventilação líquida parcial com perfluorocarbono após a reperfusão do enxerto em modelo canino de transplante pulmonar unilateral esquerdo Dissertação, UFRGS.
- Andrade, C. F., L. K. Martins, T. A. Tonietto, C. Koefender, L. C. Anflor, Jr., N. B. da Silva, J. C. Felicetti, J. Camargo Jde, E. A. Fortis and P. F. Cardoso (2004). "Partial liquid ventilation with perfluorodecalin following unilateral canine lung allotransplantation in non-heart-beating donors." J Heart Lung Transplant **23**(2): 242-251.
- Ardehali, A., H. Laks, M. Levine, R. Shpiner, D. Ross, L. D. Watson, O. Shvartz, S. Sangwan and P. F. Waters (2001). "A prospective trial of inhaled nitric oxide in clinical lung transplantation." Transplantation **72**(1): 112-115.
- Arnould, T., C. Michiels and J. Remacle (1993). "Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b, and ICAM-1." Am J Physiol **264**(5 Pt 1): C1102-1110.

- Aruoma, O. I., B. Halliwell, B. M. Hoey and J. Butler (1989). "The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid." Free Radic Biol Med **6**(6): 593-597.
- Baek, S. H., J. Y. Kim, J. H. Choi, E. M. Park, M. Y. Han, C. H. Kim, Y. S. Ahn and Y. M. Park (2000). "Reduced glutathione oxidation ratio and 8 ohdG accumulation by mild ischemic pretreatment." Brain Res **856**(1-2): 28-36.
- Baggiolini, M., A. Walz and S. L. Kunkel (1989). "Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils." J Clin Invest **84**(4): 1045-1049.
- Bakker, J., H. Zhang, M. Depierreux, S. van Asbeck and J. L. Vincent (1994). "Effects of N-acetylcysteine in endotoxic shock." J Crit Care **9**(4): 236-243.
- Barp, J., A. S. Araujo, T. R. Fernandes, K. V. Rigatto, S. Llesuy, A. Bello-Klein and P. Singal (2002). "Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones." Braz J Med Biol Res **35**(9): 1075-1081.
- Bergamini, S., C. Rota, R. Canali, M. Staffieri, F. Daneri, A. Bini, F. Giovannini, A. Tomasi and A. Iannone (2001). "N-acetylcysteine inhibits in vivo nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase." Nitric Oxide **5**(4): 349-360.
- Bhabra, M. S., D. N. Hopkinson, T. E. Shaw and T. L. Hooper (1996). "Relative importance of prostaglandin/cyclic adenosine monophosphate and nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathways in lung preservation." Ann Thorac Surg **62**(5): 1494-1499.
- Bonanomi, L. and A. Gazzaniga (1980). "Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine." Eur J Respir Dis Suppl **111**: 45-51.
- Bonser, R. S., L. S. Fragomeni, S. W. Jamieson, R. J. Fischel, K. M. Harris, B. J. Edwards, D. Rotenberg and M. P. Kaye (1991). "Effects of prostaglandin E1 in twelve-hour lung preservation." J Heart Lung Transplant **10**(2): 310-315; discussion 316.
- Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-716.
- Chang, H. Y. and X. Yang (2000). "Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases." Microbiol Mol Biol Rev **64**(4): 821-846.
- Chatterjee, S. and A. B. Fisher (2004). "ROS to the rescue." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(4): L704-705.

- Chen, C. Z., R. C. Gallagher, P. Ardery, W. Dyckman and H. B. Low (1996). "Retrograde versus antegrade flush in canine left lung preservation for six hours." J Heart Lung Transplant **15**(4): 395-403.
- Chiang, C. H., H. I. Pai and S. L. Liu (2008). "Ventilator-induced lung injury (VILI) promotes ischemia/reperfusion lung injury (I/R) and NF-kappaB antibody attenuates both injuries." Resuscitation **79**(1): 147-154.
- Chien, S., F. Zhang, W. Niu, M. T. Tseng and L. Gray, Jr. (2000). "Comparison of university of wisconsin, euro-collins, low-potassium dextran, and krebs-henseleit solutions for hypothermic lung preservation." J Thorac Cardiovasc Surg **119**(5): 921-930.
- Christie, J. D., R. M. Kotloff, A. Pochettino, S. M. Arcasoy, B. R. Rosengard, J. R. Landis and S. E. Kimmel (2003). "Clinical risk factors for primary graft failure following lung transplantation." Chest **124**(4): 1232-1241.
- Christie, J. D., J. S. Sager, S. E. Kimmel, V. N. Ahya, C. Gaughan, N. P. Blumenthal and R. M. Kotloff (2005). "Impact of primary graft failure on outcomes following lung transplantation." Chest **127**(1): 161-165.
- Christie, J. D., D. Van Raemdonck, M. de Perrot, M. Barr, S. Keshavjee, S. Arcasoy, J. Orens and I. W. G. o. P. L. G. Dysfunction (2005). "Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part I: introduction and methods." J Heart Lung Transplant **24**(10): 1451-1453.
- Conger, J. D. and J. V. Weil (1995). "Abnormal vascular function following ischemia-reperfusion injury." J Investig Med **43**(5): 431-442.
- Conte, J. V. and W. A. Baumgartner (2000). "Overview and future practice patterns in cardiac and pulmonary preservation." J Card Surg **15**(2): 91-107.
- Cooper, J. D., G. A. Patterson and E. P. Trulock (1994). "Results of single and bilateral lung transplantation in 131 consecutive recipients. Washington University Lung Transplant Group." J Thorac Cardiovasc Surg **107**(2): 460-470; discussion 470-461.
- Csontos, C., B. Rezman, V. Foldi, L. Bogar, L. Drenkovics, E. Roth, G. Weber and J. Lantos (2012). "Effect of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress and inflammation after severe burn." Burns **38**(3): 428-437.
- Cuzzocrea, S., E. Mazzon, G. Costantino, I. Serraino, A. De Sarro and A. P. Caputi (2000). "Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury." Cardiovasc Res **47**(3): 537-548.

- D'Armini, A. M., C. S. Roberts, P. K. Griffith, J. J. Lemasters and T. M. Egan (1994). "When does the lung die? I. Histochemical evidence of pulmonary viability after "death"." J Heart Lung Transplant **13**(5): 741-747.
- Dalton, T. P., H. G. Shertzer and A. Puga (1999). "Regulation of gene expression by reactive oxygen." Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**: 67-101.
- Date, H., A. Matsumura, J. K. Manchester, H. Obo, O. Lima, J. M. Cooper, S. Sundaresan, O. H. Lowry and J. D. Cooper (1993). "Evaluation of lung metabolism during successful twenty-four-hour canine lung preservation." J Thorac Cardiovasc Surg **105**(3): 480-491.
- de Kerchove, L., M. Boodhwani, P. Y. Etienne, A. Poncelet, D. Glineur, P. Noirhomme, J. Rubay and G. El Khoury (2010). "Preservation of the pulmonary autograft after failure of the Ross procedure." Eur J Cardiothorac Surg **38**(3): 326-332.
- de Perrot, M., R. S. Bonser, J. Dark, R. F. Kelly, D. McGiffin, R. Menza, O. Pajaro, S. Schueler, G. M. Verleden and I. W. G. o. P. L. G. Dysfunction (2005). "Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part III: donor-related risk factors and markers." J Heart Lung Transplant **24**(10): 1460-1467.
- de Perrot, M., S. Fischer, M. Liu, R. Jin, X. H. Bai, T. K. Waddell and S. Keshavjee (2001). "Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury: a shift from pro- to anti-inflammatory cytokines." Transplantation **72**(9): 1505-1512.
- de Perrot, M. and S. Keshavjee (2004). "Lung preservation." Semin Thorac Cardiovasc Surg **16**(4): 300-308.
- de Perrot, M., M. Liu, T. K. Waddell and S. Keshavjee (2003). "Ischemia-reperfusion-induced lung injury." Am J Respir Crit Care Med **167**(4): 490-511.
- DeCampos, K. N., S. Keshavjee, M. Liu and A. S. Slutsky (1998). "Prevention of rapid reperfusion-induced lung injury with prostaglandin E1 during the initial period of reperfusion." J Heart Lung Transplant **17**(11): 1121-1128.
- Deeb, G. M., C. M. Grum, M. J. Lynch, T. P. Guynn, K. P. Gallagher, A. G. Ljungman, S. F. Bolling and M. L. Morganroth (1990). "Neutrophils are not necessary for induction of ischemia-reperfusion lung injury." J Appl Physiol **68**(1): 374-381.

Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.

Drost, E. M. and W. MacNee (2002). "Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis." Eur J Immunol **32**(2): 393-403.

Eckenhoff, R. G., C. Dodia, Z. Tan and A. B. Fisher (1992). "Oxygen-dependent reperfusion injury in the isolated rat lung." J Appl Physiol **72**(4): 1454-1460.

Egan, T. M., K. S. Ulicny, Jr., C. J. Lambert, Jr. and B. R. Wilcox (1993). "Effect of a free radical scavenger on cadaver lung transplantation." Ann Thorac Surg **55**(6): 1453-1459.

Eppinger, M. J., G. M. Deeb, S. F. Bolling and P. A. Ward (1997). "Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung." Am J Pathol **150**(5): 1773-1784.

Esme, H., H. Fidan, O. Solak, F. H. Dilek, R. Demirel and M. Unlu (2006). "Beneficial effects of supplemental nitric oxide donor given during reperfusion period in reperfusion-induced lung injury." Thorac Cardiovasc Surg **54**(7): 477-483.

Farrukh, I. S., J. R. Michael, S. P. Peters, A. M. Sciuto, N. F. Adkinson, Jr., H. S. Freeland, A. Paky, E. W. Spannhake, W. R. Summer and G. H. Gurtner (1988). "The role of cyclooxygenase and lipoxygenase mediators in oxidant-induced lung injury." Am Rev Respir Dis **137**(6): 1343-1349.

Ferreira, A. L. A. and L. S. Matsubara (1997). "Radicaís livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo." Rev Ass Med Brasil **43**(1): 61-68.

Fiser, S. M., C. G. Tribble, S. M. Long, A. K. Kaza, J. T. Cope, V. E. Laubach, J. A. Kern and I. L. Kron (2001). "Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response." J Thorac Cardiovasc Surg **121**(6): 1069-1075.

Ghosh, S., M. J. May and E. B. Kopp (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 225-260.

Granger, D. N., G. Rutili and J. M. McCord (1981). "Superoxide radicals in feline intestinal ischemia." Gastroenterology **81**(1): 22-29.

- Greijer, A. E. and E. van der Wall (2004). "The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis." Journal of clinical pathology **57**(10): 1009-1014.
- Grisham, M. B., L. A. Hernandez and D. N. Granger (1986). "Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia." Am J Physiol **251**(4 Pt 1): G567-574.
- Grissom, C. K., J. F. Orme, Jr., L. D. Richer, T. M. McIntyre, G. A. Zimmerman and M. R. Elstad (2003). "Platelet-activating factor acetylhydrolase is increased in lung lavage fluid from patients with acute respiratory distress syndrome." Crit Care Med **31**(3): 770-775.
- Gross, A., X. M. Yin, K. Wang, M. C. Wei, J. Jockel, C. Milliman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and S. J. Korsmeyer (1999). "Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death." The Journal of biological chemistry **274**(2): 1156-1163.
- Halliwell, B. (1989). "Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis." Br J Exp Pathol **70**(6): 737-757.
- Halliwell, B. (2007). "Biochemistry of oxidative stress." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1147-1150.
- Hart, C. M. (1999). "Nitric oxide in adult lung disease." Chest **115**(5): 1407-1417.
- Heffner, J. E. and J. E. Repine (1989). "Pulmonary strategies of antioxidant defense." Am Rev Respir Dis **140**(2): 531-554.
- Inci, I., B. Erne, S. Arni, W. Jungraithmayr, D. Inci, S. Hillinger, P. Vogt, B. Leskosek and W. Weder (2010). "Prevention of primary graft dysfunction in lung transplantation by N-acetylcysteine after prolonged cold ischemia." J Heart Lung Transplant **29**(11): 1293-1301.
- Ishiyama, T., S. Dharmarajan, M. Hayama, H. Moriya, K. Grapperhaus and G. A. Patterson (2005). "Inhibition of nuclear factor kappaB by IkappaB superrepressor gene transfer ameliorates ischemia-reperfusion injury after experimental lung transplantation." J Thorac Cardiovasc Surg **130**(1): 194-201.

- Jerome, S. N., M. Dore, J. C. Paulson, C. W. Smith and R. J. Korthuis (1994). "P-selectin and ICAM-1-dependent adherence reactions: role in the genesis of postischemic no-reflow." Am J Physiol **266**(4 Pt 2): H1316-1321.
- Kelly, R. F. (2000). "Current strategies in lung preservation." J Lab Clin Med **136**(6): 427-440.
- Kim, Y. S., D. Y. Jhon and K. Y. Lee (2004). "Involvement of ROS and JNK1 in selenite-induced apoptosis in Chang liver cells." Exp Mol Med **36**(2): 157-164.
- King, R. C., O. A. Binns, F. Rodriguez, R. C. Kanithanon, T. M. Daniel, W. D. Spotnitz, C. G. Tribble and I. L. Kron (2000). "Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation." Ann Thorac Surg **69**(6): 1681-1685.
- Kuwano, K. and N. Hara (2000). "Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family." Am J Respir Cell Mol Biol **22**(2): 147-149.
- Land, W. G. (2005). "The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation." Transplantation **79**(5): 505-514.
- Latini, A., K. Scussiato, R. B. Rosa, S. Llesuy, A. Bello-Klein, C. S. Dutra-Filho and M. Wajner (2003). "D-2-hydroxyglutaric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats." Eur J Neurosci **17**(10): 2017-2022.
- Le Cras, T. D. and I. F. McMurtry (2001). "Nitric oxide production in the hypoxic lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(4): L575-582.
- Lee, J. C., J. D. Christie and S. Keshavjee (2010). "Primary graft dysfunction: definition, risk factors, short- and long-term outcomes." Semin Respir Crit Care Med **31**(2): 161-171.
- Leite, P. F., A. Danilovic, P. Moriel, K. Dantas, S. Marklund, A. P. Dantas and F. R. Laurindo (2003). "Sustained decrease in superoxide dismutase activity underlies constrictive remodeling after balloon injury in rabbits." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(12): 2197-2202.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-489.

- Liu, J. and A. Mori (1999). "Stress, aging, and brain oxidative damage." Neurochem Res **24**(11): 1479-1497.
- Liu, J., X. Wang, M. K. Shigenaga, H. C. Yeo, A. Mori and B. N. Ames (1996). "Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats." FASEB J **10**(13): 1532-1538.
- Liu, M., L. Tremblay, S. D. Cassivi, X. H. Bai, E. Mourgeon, A. F. Pierre, A. S. Slutsky, M. Post and S. Keshavjee (2000). "Alterations of nitric oxide synthase expression and activity during rat lung transplantation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **278**(5): L1071-1081.
- Matsuzaki, Y., T. K. Waddell, J. D. Puskas, T. Hirai, S. Nakajima, A. S. Slutsky and G. A. Patterson (1993). "Amelioration of post-ischemic lung reperfusion injury by prostaglandin E1." Am Rev Respir Dis **148**(4 Pt 1): 882-889.
- McClintock, D. S., M. T. Santore, V. Y. Lee, J. Brunelle, G. R. Budinger, W. X. Zong, C. B. Thompson, N. Hay and N. S. Chandel (2002). "Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death." Molecular and cellular biology **22**(1): 94-104.
- McCord, J. M. (1985). "Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury." N Engl J Med **312**(3): 159-163.
- McCord, J. M. and R. S. Roy (1982). "The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia." Can J Physiol Pharmacol **60**(11): 1346-1352.
- Meade, M. O., J. T. Granton, A. Matte-Martyn, K. McRae, B. Weaver, P. Cripps, S. H. Keshavjee and P. Toronto Lung Transplant (2003). "A randomized trial of inhaled nitric oxide to prevent ischemia-reperfusion injury after lung transplantation." Am J Respir Crit Care Med **167**(11): 1483-1489.
- Mehta, S. (2005). "The effects of nitric oxide in acute lung injury." Vascul Pharmacol **43**(6): 390-403.
- Menger, M. D. (1995). "Microcirculatory disturbances secondary to ischemia-reperfusion." Transplant Proc **27**(5): 2863-2865.
- Minotti, G. and S. D. Aust (1987). "The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide." J Biol Chem **262**(3): 1098-1104.
- Nath, B. and G. Szabo (2012). "Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases." Hepatology **55**(2): 622-633.

- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." Trends in biochemical sciences **22**(8): 299-306.
- Novick, R. J., K. E. Gehman, I. S. Ali and J. Lee (1996). "Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity." Ann Thorac Surg **62**(1): 302-314.
- Ogawa, S., H. Gerlach, C. Esposito, A. Pasagian-Macaulay, J. Brett and D. Stern (1990). "Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties." J Clin Invest **85**(4): 1090-1098.
- Okuda, M., H. C. Lee, B. Chance and C. Kumar (1992). "Role of extracellular Ca²⁺ in ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused rat liver." Circ Shock **37**(3): 209-219.
- Ovechkin, A. V., D. Lominadze, K. C. Sedoris, E. Gozal, T. W. Robinson and A. M. Roberts (2005). "Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates platelet adhesion in subpleural arterioles caused by lung ischemia-reperfusion in rabbits." J Appl Physiol **99**(6): 2423-2432.
- Parks, D. A. and D. N. Granger (1986). "Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation." Am J Physiol **250**(6 Pt 1): G749-753.
- Parks, D. A., T. K. Williams and J. S. Beckman (1988). "Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation." Am J Physiol **254**(5 Pt 1): G768-774.
- Paterson, R. L., H. F. Galley and N. R. Webster (2003). "The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis." Crit Care Med **31**(11): 2574-2578.
- Pegg, D. E. (1986). "Organ preservation." Surg Clin North Am **66**(3): 617-632.
- Perrin, G., A. Roch, P. Michelet, M. Reynaud-Gaubert, P. Thomas, C. Doddoli and J. P. Auffray (2006). "Inhaled nitric oxide does not prevent pulmonary edema after lung transplantation measured by lung water content: a randomized clinical study." Chest **129**(4): 1024-1030.
- Pettenuzzo, L. F., P. F. Schuck, A. T. Wyse, C. M. Wannmacher, C. S. Dutra-Filho, C. A. Netto and M. Wajner (2003). "Ascorbic acid prevents water maze behavioral deficits caused by early postnatal methylmalonic acid administration in the rat." Brain Res **976**(2): 234-242.

- Phillips, G. J., W. Mohammed and F. J. Kelly (1995). "Oxygen-induced lung injury in the pre-term guinea pig: the role of leukotriene B4." Respir Med **89**(9): 607-613.
- Pinheiro, B. V., M. A. Holanda, F. G. Araujo and H. Romaldini (1999). "Lesão pulmonar de reperfusão." J Pneumol **25**(2): 124-136.
- Puskas, J. D., T. Hirai, N. Christie, E. Mayer, A. S. Slutsky and G. A. Patterson (1992). "Reliable thirty-hour lung preservation by donor lung hyperinflation." J Thorac Cardiovasc Surg **104**(4): 1075-1083.
- Rahman, I., J. Marwick and P. Kirkham (2004). "Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression." Biochem Pharmacol **68**(6): 1255-1267.
- Reyes, Y. A., T. Shimoyama, H. Akamatsu and M. Sunamori (2006). "MCI-186 (edaravone), a free radical scavenger, attenuates ischemia-reperfusion injury and activation of phospholipase A(2) in an isolated rat lung model after 18 h of cold preservation." Eur J Cardiothorac Surg **29**(3): 304-311.
- Richter, N., G. Raddatz, G. Steinhoff, H. J. Schafers and H. J. Schlitt (1994). "Transmission of donor lymphocytes in clinical lung transplantation." Transpl Int **7**(6): 414-419.
- Rossi, D. and G. Gaidano (2003). "Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease." Haematologica **88**(2): 212-218.
- Sagone, A. L., Jr., R. M. Husney, M. D. Wewers, D. J. Herzyk and W. B. Davis (1989). "Effect of dimethylthiourea on the neutrophil myeloperoxidase pathway." J Appl Physiol **67**(3): 1056-1062.
- Sakamaki, F., H. Hoffmann, C. Muller, H. Dienemann, K. Messmer and F. W. Schildberg (1997). "Reduced lipid peroxidation and ischemia-reperfusion injury after lung transplantation using low-potassium dextran solution for lung preservation." Am J Respir Crit Care Med **156**(4 Pt 1): 1073-1081.
- Sanner, B. M., U. Meder, W. Zidek and M. Tepel (2002). "Effects of glucocorticoids on generation of reactive oxygen species in platelets." Steroids **67**(8): 715-719.
- Sarnstrand, B., A. Tunek, K. Sjodin and A. Hallberg (1995). "Effects of N-acetylcysteine stereoisomers on oxygen-induced lung injury in rats." Chem Biol Interact **94**(2): 157-164.

- Scannell, G. (1996). "Leukocyte responses to hypoxic/ischemic conditions." New Horiz **4**(2): 179-183.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism." Cell **47**(6): 921-928.
- Sener, G., O. Tosun, A. O. Sehirli, A. Kacmaz, S. Arbak, Y. Ersoy and G. Ayanoglu-Dulger (2003). "Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion." Life Sci **72**(24): 2707-2718.
- Sherry, B. and A. Cerami (1988). "Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses." J Cell Biol **107**(4): 1269-1277.
- Shreeniwas, R., S. Koga, M. Karakurum, D. Pinsky, E. Kaiser, J. Brett, B. A. Wolitzky, C. Norton, J. Plocinski, W. Benjamin and et al. (1992). "Hypoxia-mediated induction of endothelial cell interleukin-1 alpha. An autocrine mechanism promoting expression of leukocyte adhesion molecules on the vessel surface." J Clin Invest **90**(6): 2333-2339.
- Sigala, I., P. Zacharatos, D. Toumpanakis, T. Michailidou, O. Noussia, S. Theocharis, C. Roussos, A. Papapetropoulos and T. Vassilakopoulos (2011). "MAPKs and NF-kappaB differentially regulate cytokine expression in the diaphragm in response to resistive breathing: the role of oxidative stress." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **300**(5): R1152-1162.
- Singal, P. K., N. Khaper, F. Farahmand and A. Bello-Klein (2000). "Oxidative stress in congestive heart failure." Curr Cardiol Rep **2**(3): 206-211.
- Southorn, P. A. and G. Powis (1988). "Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions." Mayo Clin Proc **63**(4): 381-389.
- Souza, J. A., C. Rossa, Jr., G. P. Garlet, A. V. Nogueira and J. A. Cirelli (2012). "Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease." J Appl Oral Sci **20**(2): 128-138.
- Sprong, R. C., A. M. Winkelhuyzen-Janssen, C. J. Aarsman, J. F. van Oirschot, T. van der Bruggen and B. S. van Asbeck (1998). "Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality." Am J Respir Crit Care Med **157**(4 Pt 1): 1283-1293.

- Stammberger, U., A. Gaspert, S. Hillinger, P. Vogt, B. Odermatt, W. Weder and R. A. Schmid (2000). "Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation." Ann Thorac Surg **69**(5): 1532-1536.
- Steimle, C. N., T. P. Guynn, M. L. Morganroth, S. F. Bolling, K. Carr and G. M. Deeb (1992). "Neutrophils are not necessary for ischemia-reperfusion lung injury." Ann Thorac Surg **53**(1): 64-72; discussion 72-63.
- Sun, C. K., C. H. Yen, Y. C. Lin, T. H. Tsai, L. T. Chang, Y. H. Kao, S. Chua, M. Fu, S. F. Ko, S. Leu and H. K. Yip (2011). "Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells markedly reduced acute ischemia-reperfusion lung injury in a rodent model." J Transl Med **9**: 118.
- Swoboda, L., D. E. Clancy, M. A. Donnebrink and C. M. Rieder-Nelissen (1993). "The influence of verapamil on lung preservation. A study on rabbit lungs with a reperfusion model allowing physiological loading." Thorac Cardiovasc Surg **41**(2): 85-92.
- Takeyoshi, I., K. Iwanami, N. Kamoshita, T. Takahashi, J. Kobayashi, N. Tomizawa, Y. Kawashima, K. Matsumoto and Y. Morishita (2001). "Effect of lazaroid U-74389G on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs." J Invest Surg **14**(2): 83-92.
- Tepel, M. (2003). "Acetylcysteine for the prevention of radiocontrast -induced nephropathy." Minerva Cardioangiol **51**(5): 525-530.
- Turut, H., H. Ciralik, M. Kilinc, D. Ozbag and S. S. Imrek (2009). "Effects of early administration of dexamethasone, N-acetylcysteine and aprotinin on inflammatory and oxidant-antioxidant status after lung contusion in rats." Injury **40**(5): 521-527.
- Ucar, G., E. Topaloglu, H. B. Kandilci and B. Gumusel (2005). "Effect of ischemic preconditioning on reactive oxygen species-mediated ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused rat lung." Clin Biochem **38**(7): 681-684.
- Uhlig, S., R. Goggel and S. Engel (2005). "Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung." Pharmacol Rep **57 Suppl**: 206-221.
- van de Schepop, H. A., J. S. de Jong, P. J. van Diest and J. P. Baak (1996). "Counting of apoptotic cells: a methodological study in invasive breast cancer." Clinical molecular pathology **49**(4): M214-217.

van der Kraaij, A. M., L. J. Mostert, H. G. van Eijk and J. F. Koster (1988). "Iron-load increases the susceptibility of rat hearts to oxygen reperfusion damage. Protection by the antioxidant (+)-cyanidanol-3 and deferoxamine." Circulation **78**(2): 442-449.

Wang, L. S., K. Yoshikawa, S. Miyoshi, K. Nakamoto, C. M. Hsieh, F. Yamazaki, P. F. Guerreiro Cardoso, H. J. Schaefer, J. Brito, S. H. Keshavjee and et al. (1989). "The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a simple ex vivo rabbit model used for functional assessment." J Thorac Cardiovasc Surg **98**(3): 333-342.

Ware, L. B., J. A. Golden, W. E. Finkbeiner and M. A. Matthay (1999). "Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation." Am J Respir Crit Care Med **159**(3): 980-988.

Waxman, K. (1996). "Shock: ischemia, reperfusion, and inflammation." New Horiz **4**(2): 153-160.

Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-730.

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

Yamashita, H., S. Akamine, Y. Sumida, M. Inoue, T. Sawada, T. Nagayasu and T. Oka (2004). "Inhaled nitric oxide attenuates apoptosis in ischemia-reperfusion injury of the rabbit lung." Ann Thorac Surg **78**(1): 292-297.

Yokomise, H., T. Ueno, F. Yamazaki, S. Keshavjee, A. Slutsky and G. Patterson (1990). "The effect and optimal time of administration of verapamil on lung preservation." Transplantation **49**(6): 1039-1043.

Yoshimura, K., S. Nakagawa, S. Koyama, T. Kobayashi and T. Homma (1994). "Roles of neutrophil elastase and superoxide anion in leukotriene B₄-induced lung injury in rabbit." J Appl Physiol **76**(1): 91-96.

Zaas, D. and S. M. Palmer (2003). "Respiratory failure early after lung transplantation: now that we know the extent of the problem, what are the solutions?" Chest **123**(1): 14-16.

Zafarullah, M., W. Q. Li, J. Sylvester and M. Ahmad (2003). "Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions." Cell Mol Life Sci **60**(1): 6-20.

Zhang, Y. X., H. Fan, Y. Shi, S. T. Xu, Y. F. Yuan, R. H. Zheng and Q. Wang (2010). "Prevention of lung ischemia-reperfusion injury by short hairpin RNA-mediated caspase-3 gene silencing." J Thorac Cardiovasc Surg **139**(3): 758-764.

Ziment, I. (1988). "Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic." Biomed Pharmacother **42**(8): 513-519.

Zimmerman, B. J. and D. N. Granger (1994). "Mechanisms of reperfusion injury." Am J Med Sci **307**(4): 284-292.