

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**Abordagem farmacológica da lesão  
pulmonar induzida por isquémia –  
reperfusão**

Andreia Simões Maia

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**2010**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**Abordagem farmacológica da lesão  
pulmonar induzida por isquémia –  
reperfusão**

Andreia Simões Maia

**Tese orientada por Dr. João Rocha**

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**2010**

# Agradecimentos

A elaboração deste trabalho, assim como todo o percurso académico que o antecedeu, só foi possível graças à colaboração e contributo de várias pessoas, às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento.

Ao Dr. João Rocha, pela orientação.

À Dra. Isabel Ramalinho, pelo empenho e dedicação ao curso e aos finalistas.

À Dra. Vera Ribeiro, pelo empenho, dedicação e paciência que sempre demonstrou face aos obstáculos que foram surgindo, ao longo dos últimos anos de curso.

A todos os professores que, ao longo destes anos, contribuíram para a minha formação académica e profissional.

Aos meus pais, um agradecimento especial, por tudo o que sempre fizeram por mim. Pelo apoio, paciência, compreensão, preocupação, pelas palavras de coragem, por me fazerem acreditar que o esforço seria recompensado, pelo esforço que fizeram para me proporcionar esta “aventura” que foi estudar na Universidade do Algarve e, sobretudo, por estarem sempre lá.

Ao meu irmão, pela espontaneidade, companheirismo e boa disposição.

À minha avó, pela preocupação e por ser uma segunda mãe.

Às minhas amigas, em especial, Ana, Catarina e Inês, pela amizade, companheirismo, apoio, pelas intermináveis conversas, desabafos e afins..., e por terem feito com que estes anos no Algarve fossem especiais.

Ao Tiago, pela preciosa ajuda na finalização deste trabalho.

E a todos os que, de alguma forma, contribuíram para o meu percurso académico.

## Resumo

A lesão pulmonar induzida por isquémia – reperfusão (I/R) é uma das complicações mais frequentes e mais graves que ocorre após o transplante pulmonar, podendo culminar na falência do órgão e até na morte do doente. Os mecanismos inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da lesão pulmonar de I/R são bastante complexos, e envolvem a formação de espécies reactivas de oxigénio e a libertação de mediadores inflamatórios (citocinas, endotelinas, lípidos, moléculas de adesão, entre outras), responsáveis pela activação, migração e agregação leucocitária, e também pela adesão leucocitária à parede endotelial. Estes processos estão encadeados e resultam no aumento da permeabilidade e edema vascular, que caracterizam este tipo de lesão.

Ao longo dos últimos anos, o progresso no conhecimento dos processos fisiopatológicos da lesão pulmonar de I/R permitiu que, em teoria, fossem consideradas novas abordagens farmacológicas para a sua prevenção e/ou tratamento. Contudo, poucas são utilizadas na prática clínica pois, a maioria delas, encontra – se ainda sob investigação.

Visto que o transplante pulmonar assume, cada vez mais, um papel de destaque na terapêutica de diversas doenças pulmonares terminais, torna-se indispensável que sejam implementados mais estudos que contribuam para a optimização das estratégias terapêuticas existentes e/ou para a exploração de novas abordagens farmacológicas.

**Palavras – chave:** isquémia; reperfusão; lesão pulmonar; transplante pulmonar; abordagens farmacológicas

## **Abstract**

The lung injury induced by ischemia – reperfusion (I/R) is one of the most frequent and severe complication that occurs after lung transplantation and may result in graft failure and even death of the patient. The inflammatory mechanisms involved in the pathophysiology of I/R lung injury are complex and involve the formation of reactive oxygen species and release of inflammatory mediators (cytokines, endothelins, lipids, adhesion molecules, among others), responsible for activation, migration and leukocyte aggregation, and also by leukocyte adhesion to the endothelial wall. These processes are linked and result in increased vascular permeability and edema that characterize this type of injury.

Over the past years, the progress in understanding the pathophysiological processes of I/R lung injury allowed that, in theory, be considered new pharmacological approaches to its prevention and/or treatment. However, few are used in clinical practice because most of them are still under investigation.

Since the lung transplant takes, increasingly, an important role in the treatment of various terminal lung diseases, the implementation of more studies that contribute to the optimization of therapeutic strategies using existing and/or the exploitation of new pharmacological approaches becomes essential.

**Keywords:** ischemia; reperfusion; lung injury; lung transplant; pharmacological approaches

# Índice

<b>I – Introdução .....</b>	<b>1</b>
I.I – Aspectos gerais .....	1
I.II – Situações Clínicas.....	2
<b>II – Fisiopatologia da lesão pulmonar induzida por isquémia – reperfusão.....</b>	<b>5</b>
II.I – Formação de Espécies Reactivas de Oxigénio .....	5
II.II – Libertação de ferro .....	6
II.III – Depleção dos níveis de monóxido de azoto.....	6
II.IV – Activação Leucocitária .....	8
II.V – Libertação de histamina .....	9
II.VI – Libertação de Mediadores Pró – Inflamatórios .....	9
II.VI.I – Citocinas .....	9
II.VI.I.I – Factor de Necrose Tumoral – $\alpha$ .....	9
II.VI.I.II – Interleucinas.....	11
II.VI.I.III – Interferão - $\gamma$ .....	13
II.VI.II – Endotelinas .....	13
II.VI.III – Moléculas Lipídicas.....	14
II.VI.IV – Sistema do Complemento.....	16
II.VII – Adesão Leucocitária .....	20
II.VII.I – Moléculas de adesão .....	22
II.VII.I.I – Selectinas .....	22
II.VII.I.II – Integrinas .....	23
II.VII.I.III – Imunoglobulinas .....	24
II.VII.II – Síntese e regulação da expressão de moléculas de adesão .....	25
II.VII.II.I – Factor Nuclear – $\kappa$ B .....	25
<b>III – Abordagens farmacológicas da lesão pulmonar induzida por isquémia – reperfusão .....</b>	<b>27</b>
III.I – Surfactante pulmonar .....	27
III.II – Ventilação .....	28
III.III – Corticosteróides .....	28
III.IV – Pré – condicionamento isquémico.....	29
III.V – Hipotermia .....	30

III.VI – Terapêutica antioxidante .....	30
III.VI.II – Alopurinol.....	31
III.VI.III – Superóxido dismutase e catalase .....	32
III.VI.IV – Quelantes do ferro .....	33
III.VI.V – Via da Heme Oxigenase .....	33
III.VI.VI – Lazaróides .....	34
III.VIII – Inibição do Sistema do Complemento.....	35
III.VIII.I – Inibição da Proteína C1 .....	35
III.VIII.II – Receptor Tipo 1 do Complemento.....	36
III.VIII.III – Inibição do Receptor C3a .....	37
III.IX – Inibição das Citocinas .....	38
III.IX.I – Inibição do Factor de Necrose Tumoral – $\alpha$ .....	38
III.IX.II – Inibição das Interleucinas .....	39
III.X – Inibição da Adesão Leucocitária .....	39
III.X.I – Inibição das Selectinas .....	39
III.X.II – Inibição das Integrinas .....	41
III.X.III – Inibição das Imunoglobulinas.....	42
III.X.IV – Inibição do Factor Nuclear – $\kappa$ B .....	42
<b>IV – Conclusão .....</b>	<b>44</b>
<b>V – Bibliografia.....</b>	<b>45</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Número de transplantes pulmonares reportados por ano e tipo de procedimento. ...	3
<b>Figura 2</b> – Principais indicações para transplante pulmonar, em adultos, por ano. ....	3
<b>Figura 3</b> – Formação de espécies reactivas de oxigénio durante a isquémia – reperfusão e anóxia – reoxigenação do pulmão .....	5
<b>Figura 4</b> – Mecanismo de formação e vasodilatação mediado pelo monóxido de azoto (NO), e resposta a vários estímulos. ....	7
<b>Figura 5</b> – Potencial mecanismo de interacção entre a activação leucocitária e a libertação de citocinas durante a isquémia – reperfusão do pulmão .....	8
<b>Figura 6</b> – Mecanismo de acção intracelular do factor de necrose tumoral – $\alpha$ . ....	11
<b>Figura 7</b> – Interacção entre o factor de activação plaquetário e seu receptor.....	15
<b>Figura 8</b> – Cascata do Complemento. ....	16
<b>Figura 9</b> – Mecanismo de expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e nas células endoteliais, no decurso da resposta inflamatória .....	22
<b>Figura 10</b> – Mecanismo de activação da transcrição mediado pelo factor nuclear – $\kappa$ B .....	26
<b>Figura 11</b> – Reacção de oxidação – redução da glutatona. ....	31
<b>Figura 12</b> – Mecanismo de acção dos <i>transcription factor decoys</i> (TFD's) .....	43

## Abreviaturas e Siglas

**ADP** – Difosfato de adenosina

**Alpha – 1 –  $\alpha_1$**  – *antitrypsin deficiency emphysema*

**AMP** – Monofosfato de adenosina

**As – ODN** – *Antisense oligodeoxynucleotids*

**ATP** – Trifosfato de adenosina

**C1INH** – Inibidor da proteína C1

**C3aR** – Receptor da proteína C3a

**C4BP** – *C4 binding protein*

**CAT** – Catalase

**CF** – Fibrose cística

**CO** – Monóxido de carbono

**COPD** – Doença pulmonar obstrutiva crónica

**CR1** – Receptor tipo 1 do complemento

**DAF** – *decay accelerating factor*

**EDRF** – *Endothelium derived relaxing factor*

**eNOS** – Monóxido de azoto sintase endotelial

**eSOD** – Superóxido dismutase extracelular

**GC** – Guanil ciclase

**GMP** – Monofosfato de guanosina

**GRE** – Elemento de resposta aos glucocorticóides

**GSH** – Glutathiona reduzida

**GTP** – Trifosfato de guanosina

**I/R** – Isquémia – reperfusão

**ICAM** – Molécula de adesão intercelular endotelial

**IFN –  $\gamma$**  – Interferão –  $\gamma$

**IL – 1RA** – Antagonista do receptor da interleucina – 1

**IL** – Interleucina

**iNOS** – Monóxido de azoto sintase indutível

**IPAH** – Hipertensão arterial pulmonar idiopática

**IPF** – Fibrose pulmonar idiopática

**iSOD** – Superóxido dismutase intracelular

**LTB<sub>4</sub>** – Leucotrieno B<sub>4</sub>  
**MAC** – Complexo de ataque membranar  
**MASP** – *Mannose associated serine protease*  
**MBL** – *Mannose binding lectin*  
**MCP** – *membrane cofactor protein*  
**MHC** – Complexo de histocompatibilidade major  
**mSOD** – Superóxido dismutase mitocondrial  
**NAC** – N – acetilcisteína  
**NAD** – Dinucleótido adenina nicotinamida  
**NF – κB** – Factor nuclear – κB  
**nNOS** – Monóxido de azoto sintase neuronal  
**NO** – Monóxido de azoto  
**NOS** – Monóxido de azoto sintase  
**PAF** – Factor de activação plaquetária  
**PAFR** – Receptor do factor de activação plaquetária  
**PECAM** – *Platelet endothelial cell adhesion molecule*  
**PSGL** – *P – selectin glycoprotein 1*  
**Re – Tx** – Repetição de transplante  
**ROS** – Espécies reactiva de oxigénio  
**SOD** – Superóxido dismutase  
**SP** – Apoproteínas surfactantes  
**TACE** – Enzima de conversão do factor de necrose tumoral – α  
**TFD** – *Transcriptional factor decoys*  
**TNF – α** – Factor de necrose tumoral – α  
**TNFR** – Receptor do factor de necrose tumoral – α  
**TXA<sub>2</sub>** – Tromboxano A<sub>2</sub>  
**VCAM** – Molécula de adesão celular vascular  
**VLA** – *Very late antigen*  
**XD** – Xantina desidrogenase  
**XO** – Xantina oxidase

# I – Introdução

## I.I – Aspectos gerais

Uma determinada área ou tecido está sujeito a isquémia, quando se verifica uma interrupção ou deficiência no fornecimento sanguíneo, resultando num aporte insuficiente de oxigénio e nutrientes, durante um determinado período de tempo. A isquémia é, assim, causa de disfunção e morte de tecidos em variadas situações clínicas, sendo que as suas consequências poderão ser completamente ou parcialmente reversíveis ou irreversíveis consoante o tipo de tecido em causa, a intensidade e o tempo ao qual esteve sujeito a isquémia.<sup>1,2,3</sup>

O restabelecimento do fluxo sanguíneo, após um período de isquémia, é designado de reperfusão.<sup>4,5</sup>

O termo *lesão de isquémia – reperfusão (I/R)*, também designado lesão de reperfusão, é utilizado para definir as alterações funcionais e estruturais resultantes da reperfusão de tecidos isquémicos, inicialmente viáveis.<sup>1,4,6</sup>

Embora a restituição do fluxo sanguíneo ao tecido isquémico seja inequivocamente essencial na prevenção de danos celulares irreversíveis, evidências clínicas e experimentais têm demonstrado que as principais disfunções celulares e tecidulares observadas se relacionam com a reperfusão. Ao longo dos anos, a lesão de I/R tem sido alvo de investigação em diferentes órgãos, como o intestino, rins, coração e cérebro, entre outros. Nestes órgãos, a isquémia resulta em hipóxia ou anóxia do tecido, e diversos estudos referem um agravamento das lesões, produzidas pela isquémia, após a reintrodução do aporte de oxigénio.<sup>2,4-8</sup>

É também importante salientar que a lesão de I/R, além de afectar o órgão sujeito a isquémia, pode também danificar outros órgãos à distância. A lesão pulmonar causada por I/R intestinal é um dos exemplos dessa situação.<sup>1,6,9</sup>

A patofisiologia da lesão provocada pela isquémia – reperfusão compreende uma série de mecanismos complexos. Durante a isquémia, verifica-se uma acumulação de metabolitos tóxicos, provenientes da degradação de ATP. Na fase de reperfusão, a libertação desses metabolitos, em conjunto com a reoxigenação, promovem, por meio de reacções enzimáticas, a formação de espécies reactivas de oxigénio.<sup>3,10-12</sup> Ainda na fase de reperfusão, observa-se o desenvolvimento de uma cascata de inflamação e o conseqüente envolvimento do sistema imunitário, o que resulta na activação do endotélio vascular, aumento da sua permeabilidade,

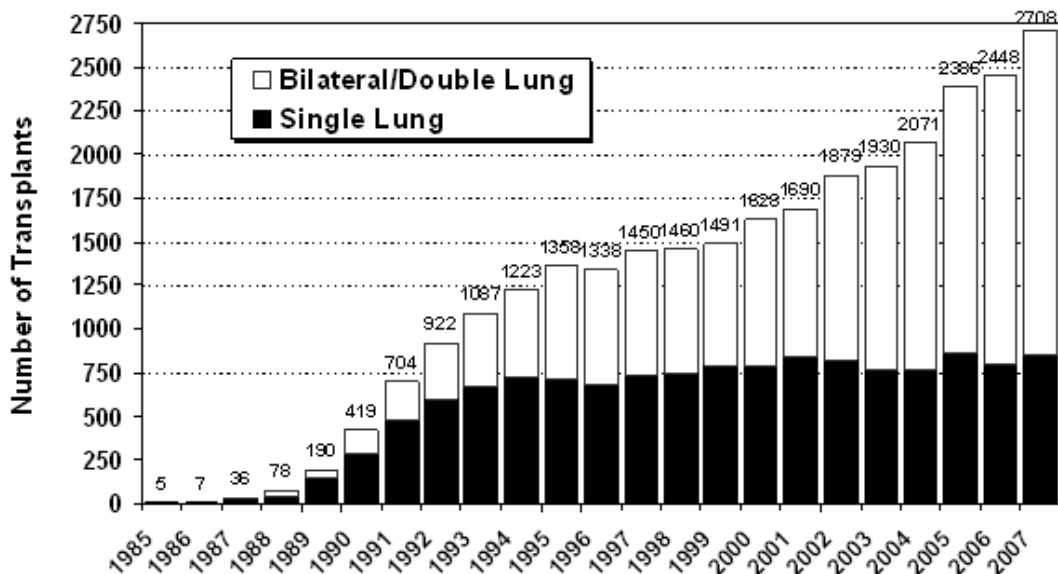
expressão de moléculas de adesão e de mediadores pró – inflamatórios (citocinas, factores de activação plaquetária, leucotrienos, selectinas, endotelinas), activação da cascata do complemento e mobilização de leucócitos polimorfonucleares.<sup>10,13,14</sup>

Considerando especificamente a isquémia – reperfusão do pulmão, é importante salientar que esta difere fisiologicamente daquela que se observa noutros órgãos. A isquémia pulmonar não resulta obrigatoriamente em hipóxia ou anóxia do tecido, pois as células do tecido pulmonar têm a capacidade de utilizar o oxigénio proveniente das trocas gasosas alveolares, se a ventilação se mantiver. Assim, a isquémia – reperfusão pulmonar não é sinónimo de anóxia – reoxigenação, apesar de também originar espécies reactivas de oxigénio e, conseqüentemente, lesões oxidativas.<sup>7,8,11,12,15</sup> Contudo, o tempo de isquémia tolerável pelo pulmão é bastante mais reduzido do que para a maioria dos outros órgãos, o que reforça a necessidade de aprofundar as alterações celulares que ocorrem no tecido pulmonar aquando da ocorrência de I/R.<sup>15</sup>

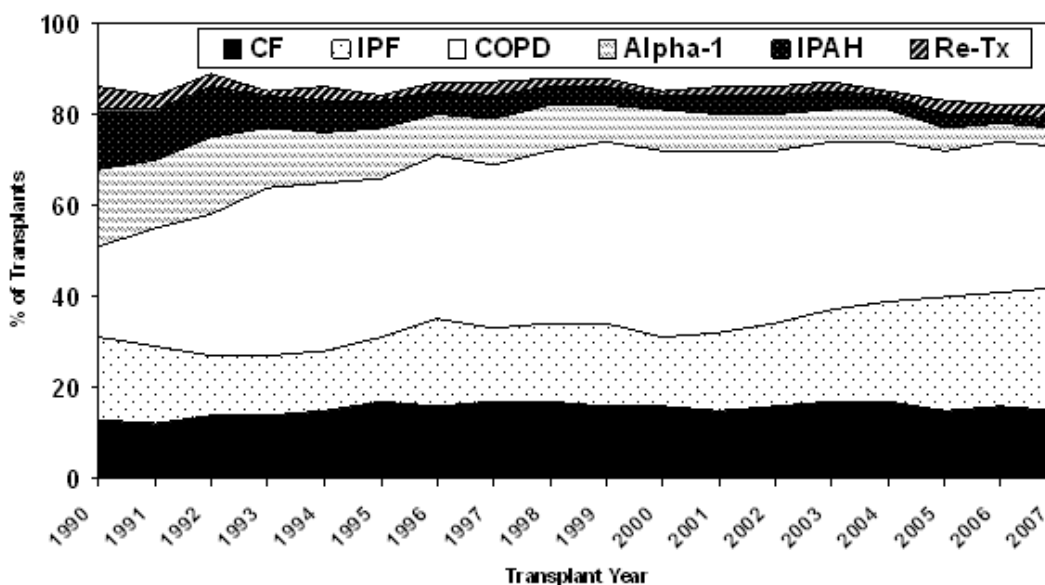
## **I.II – Situações Clínicas**

No campo da cirurgia torácica, os mecanismos responsáveis pela lesão de I/R do pulmão ocorrem frequentemente após bypass cardiopulmonar, tromboendarterectomia, ressecção (lobectomia, segmentectomia e pneumonectomia) e transplante pulmonar que é, indubitavelmente, a situação clínica que melhor representa a lesão de isquémia – reperfusão do pulmão<sup>16,17</sup>.

Ao longo dos últimos anos, observa-se um aumento muito significativo do número de transplantes pulmonares realizados (Figura 1). Tal acontece pois o transplante pulmonar tem vindo a tornar-se a terapêutica de eleição para um grande número de doenças pulmonares terminais (Figura 2), permitindo não só o prolongamento da vida dos doentes, mas também uma melhoria significativa da sua qualidade de vida<sup>15,18 – 21</sup>.



**Figura 1** - Número de transplantes pulmonares reportados por ano e tipo de procedimento. (Adaptado de Christie *et al*)<sup>22</sup>



**Figura 2** – Principais indicações para transplante pulmonar, em adultos, por ano. (Adaptado de Christie *et al*)<sup>22</sup>

Embora as taxas de sobrevivência, pós – transplante pulmonar, tenham vindo a aumentar, a lesão pulmonar de I/R continua a ter um lugar de destaque como causa de mortalidade e morbidade precoce, cuja incidência varia entre 20 a 30%<sup>18,19,20</sup>. A lesão de I/R de pulmão tem sido referenciada como a principal causa do fenómeno de “resposta de reimplantação” subsequente ao transplante pulmonar. Na maioria dos casos, a lesão é auto –

limitada e com consequências clínicas reduzidas. No entanto, em alguns doentes, a disfunção do órgão é severa e persistente, e pode conduzir ao aumento ou aceleração do fenómeno de rejeição, no período inicial pós-transplante, situação clínica que tem sido descrita como *primary graft failure*.<sup>23,24</sup> A intensidade da lesão de I/R associada ao transplante pulmonar depende de vários factores, entre os quais, a patofisiologia do receptor, a qualidade do dador e as tecnologias aplicadas quer na preservação do órgão, quer na sua implantação. Contudo, existem outras lesões que ocorrem no dador, antes do transplante, que podem contribuir para a activação de mediadores inflamatórios e amplificar as lesões de I/R, como por exemplo morte cerebral, hipotensão, trauma, pneumonia, ventilação mecânica, entre outras.<sup>18,19</sup>

Além das complicações imediatas, a lesão severa de I/R do pulmão também pode ser associada à disfunção crónica do órgão<sup>1,16</sup>. Exemplo dessas disfunções pulmonares tardias é o desenvolvimento de bronquiolite obstrutiva, que pode ser vista como uma forma de rejeição crónica, que resulta numa constrição progressiva dos bronquíolos respiratórios<sup>21,25</sup>.

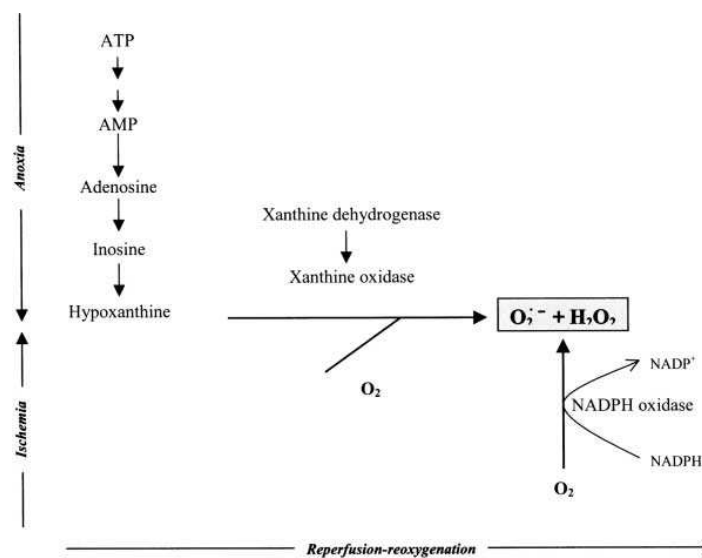
O desenvolvimento da lesão de I/R pulmonar, além de ser responsável por uma alta taxa de mortalidade e morbidade, está também associada ao prolongamento da duração da ventilação mecânica e do tempo de permanência, quer nas unidades de cuidados intensivos, quer nas unidades hospitalares. A lesão de I/R do pulmão tem, portanto, um impacto significativo na recuperação do estado de saúde dos doentes e, consequentemente, no aumento do consumo dos recursos de saúde<sup>18,21</sup>.

Como já referido anteriormente, a capacidade de tolerância do pulmão à isquémia é reduzida, sendo que o tempo de isquémia aceitável para transplante pulmonar é de apenas 4 a 7 horas. Assim, a capacidade de preservar o órgão, no transplante pulmonar, é muito menor do que para outros órgãos, como o rim, fígado ou coração.<sup>20</sup>

## II – Fisiopatologia da lesão pulmonar induzida por isquémia – reperfusão

### II.I – Formação de Espécies Reactivas de Oxigénio

A primeira alteração metabólica que ocorre durante a isquémia de um tecido é a depleção de energia resultante de síntese deficiente de ATP e da sua degradação, via ADP e AMP cíclico, em hipoxantina (Figura 3).



**Figura 3** – Formação de espécies reativas de oxigénio durante a isquémia – reperfusão e anóxia – reoxigenação do pulmão. (Perrot *et al*)<sup>19</sup>

Normalmente, a hipoxantina é convertida, pela xantina desidrogenase, em xantina, com consumo de NAD<sup>+</sup>. Contudo, sob isquémia, a xantina desidrogenase (XD) encontra-se sob a forma de xantina oxidase (XO). Assim, na presença de O<sub>2</sub>, proveniente da reoxigenação do tecido, a hipoxantina é convertida, pela xantina oxidase, em espécies reativas de oxigénio (ROS), entre elas aniões superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), radicais hidroxilo (<sup>•</sup>OH) e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Além disso, a depleção de ATP provoca disfunção mitocondrial que se traduz na produção de ROS, aquando da reperfusão.<sup>26, 27</sup>

Em condições fisiológicas normais, o organismo possui mecanismos antioxidantes que neutralizam os efeitos das ROS, como por exemplo, a glutathiona e a superóxido dismutase. Contudo, em condições de I/R, além de se formar uma grande quantidade de ROS, os mecanismos antioxidantes estão diminuídos.<sup>1</sup> Assim, as ROS acumulam-se e vão reagir com

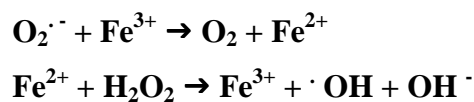
as biomoléculas, especialmente com os lípidos das membranas celulares, proteínas, e ácidos nucleicos.<sup>1, 28</sup>

A reacção das ROS com os fosfolípidos das membranas celulares conduz à peroxidação lipídica, que culmina na disfunção da membrana e lise celular. Adicionalmente, a peroxidação lipídica promove a activação da fosfolipase A<sub>2</sub>, que actua sobre os fosfolípidos da membrana celular, libertando os ácidos gordos que, por sua vez, integrarão a cascata do ácido araquidónico, originando prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos.<sup>1</sup>

Além disto, a produção de ROS acciona a activação de mediadores pró – inflamatórios, que promovem o recrutamento de neutrófilos ao local da lesão, dando início ao processo inflamatório, característico da lesão de I/R.

## II.II – Libertação de ferro

Embora o ferro seja um elemento essencial para todas as células, este pode ser altamente tóxico sob condições patofisiológicas, como o stress oxidativo, devido às suas propriedades de oxidação – redução. O ferro encontra-se, maioritariamente, armazenado nas moléculas de ferritina, sendo transportado pelas moléculas de transferrina. No entanto, existe uma quantidade de ferro “livre”, que pode participar na reacção de Fenton, em que o anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) e o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reagem com o ião ferro e produzem radicais hidroxilo (·OH):<sup>27, 29</sup>



Sob condições isquémicas, este ferro “livre” pode ser libertado da ferritina, do citocromo P450, da hemoglobina e de outras metaloproteínas, contribuindo para a amplificação da lesão oxidativa.<sup>29</sup>

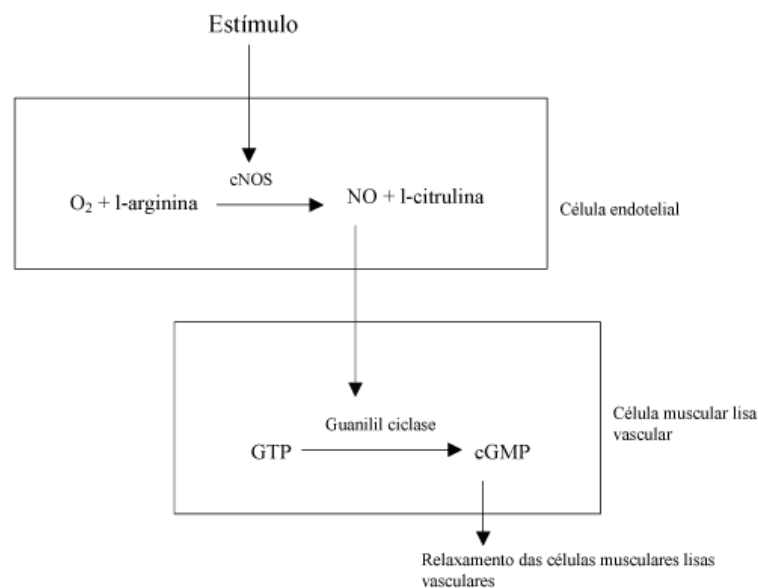
## II.III – Depleção dos níveis de monóxido de azoto

O monóxido de azoto (NO) é um mediador molecular importante, produzido por diversas células, e está envolvido em diversos processos fisiológicos no pulmão,

nomeadamente, na vasorregulação pulmonar, no relaxamento do músculo liso, na inibição da agregação plaquetária e da adesão leucocitária e na manutenção da integridade do endotélio vascular.

A produção de NO, ocorre por meio da conversão de L – arginina, em L – citrulina, pelas diferentes isoformas da monóxido de azoto sintase (NOS), na presença de O<sub>2</sub>. Duas dessas isoformas são constitutivamente expressas, a NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (nNOS). A terceira isoforma, a NOS indutível (iNOS), é induzida, ao nível da sua transcrição, por uma variedade de estímulos, entre eles as citocinas.<sup>30 – 33</sup>

A importância do NO, no contexto da lesão pulmonar de I/R, está relacionada com a sua função como *endothelium derived relaxing factor* (EDRF). Como ilustra a Figura 4, o NO, produzido nas células endoteliais, atravessa o endotélio vascular, para as células do músculo liso vascular, onde estimula a enzima guanil ciclase (GC), promovendo a formação de GMP cíclico intracelular, a partir do GTP, que resulta no relaxamento das células da musculatura lisa vascular.<sup>31, 32</sup>



**Figura 4** – Mecanismo de formação e vasodilatação mediado pelo monóxido de azoto (NO), e resposta a vários estímulos. (Cerqueira *et al*)<sup>32</sup>

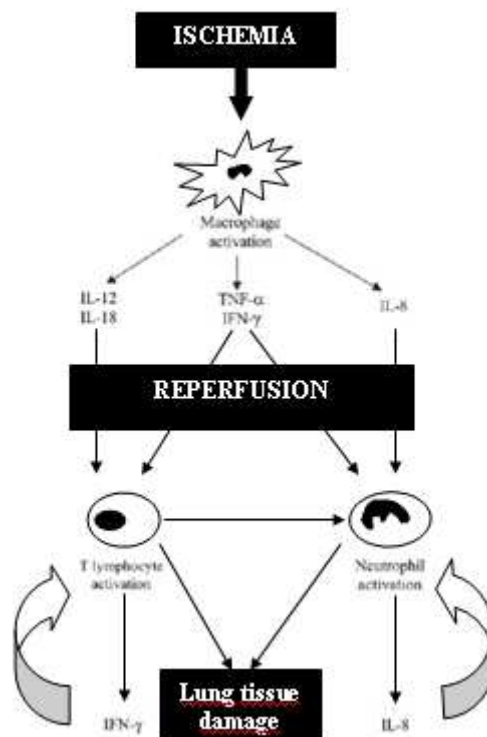
Contudo, o NO também apresenta efeitos deletérios, pois pode reagir com as ROS, produzidas durante a I/R, formando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), um radical livre de oxigénio.<sup>30, 31</sup> Esta situação é duplamente prejudicial pois, além de contribuir para o aumento da formação de ROS, inactiva o NO e os seus efeitos vasodilatadores.

Em suma, o NO apresenta efeitos benéficos importantes, nomeadamente ao nível do endotélio vascular, mas paradoxalmente também pode contribuir para a lesão celular.<sup>32</sup>

Durante a I/R pulmonar, diversos estudos referem a depleção dos níveis de NO<sup>30, 32</sup>, assim como o aumento da expressão das iNOS e eNOS<sup>30</sup>, que se deve à libertação de mediadores pró – inflamatórios. A diminuição dos níveis de NO, deverá ser resultante da sua reacção com as ROS que, como já se referiu, são amplamente produzidas durante a lesão de I/R.<sup>30</sup>

## II.IV – Activação Leucocitária

A Figura 5 permite visualizar que a activação leucocitária, durante a I/R pulmonar, ocorre segundo mecanismos bastante complexos, que estão interligados entre si.



**Figura 5** – Potencial mecanismo de interacção entre a activação leucocitária e a libertação de citocinas durante a isquemia – reperfusão do pulmão. (Adaptado de Perrot *et al*)<sup>19</sup>

Assim, a activação dos macrófagos alveolares ocorre na fase isquémica, como resposta ao stress oxidativo. Os macrófagos são, desta forma, estimulados a produzir uma série de

mediadores pró – inflamatórios, como as citocinas, que por sua vez, activam os linfócitos e os neutrófilos, já na fase de reperfusão. Por sua vez, os linfócitos e neutrófilos são responsáveis pela estimulação da produção de mais citocinas, amplificando a resposta inflamatória, e provocando lesão no tecido pulmonar.

## **II.V – Liberação de histamina**

A liberação de histamina pelos leucócitos, principalmente, pelos monócitos e linfócitos, é outra das consequências da lesão de I/R.

A histamina é armazenada em grânulos pelos mastócitos e linfócitos, sendo rapidamente libertada aquando de um estímulo inflamatório. Quando libertada, a histamina desempenha um papel fundamental na amplificação da cascata inflamatória, aumentando a permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão.<sup>34</sup>

## **II.VI – Liberação de Mediadores Pró – Inflamatórios**

### **II.VI.I – Citocinas**

As citocinas são um grupo de polipéptidos multifuncionais responsáveis pela mediação e regulação da resposta inflamatória, e tem um papel fundamental na promoção da infiltração celular no tecido lesionado. Estas são moléculas pleiotrópicas, que exercem o seu efeito localmente ou sistemicamente, de uma forma autócrina ou parácrina. As citocinas estão envolvidas em diversos mecanismos que envolvem interacções sinérgicas bem como antagónicas e exibem efeitos regulatórios positivos e negativos em várias células – alvo. No contexto da lesão pulmonar causada por I/R, o TNF –  $\alpha$ , o IFN –  $\gamma$  e as interleucinas, são as de maior relevância.<sup>35, 36</sup>

#### **II.VI.I.I – Factor de Necrose Tumoral – $\alpha$**

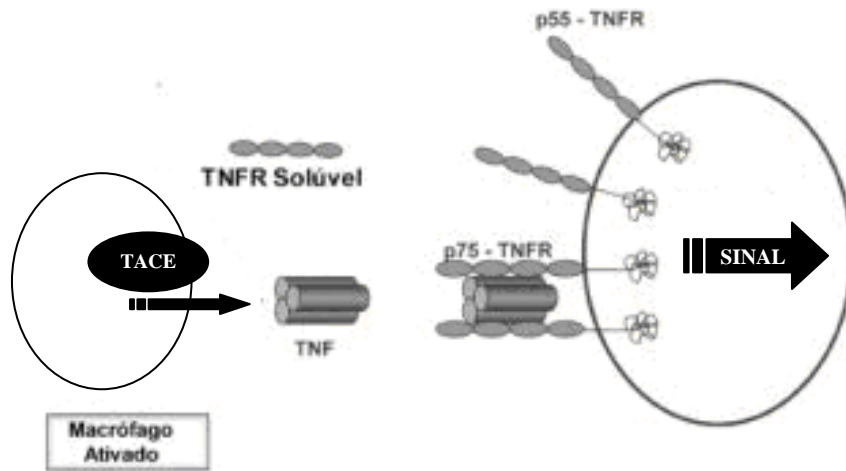
O *factor de necrose tumoral –  $\alpha$*  (*TNF –  $\alpha$* ) é uma citocina de 17 kD, que deriva de uma proteína precursora transmembranar (*membrane bound TNF –  $\alpha$* ), e é secretado por um vasto conjunto de células, incluindo monócitos, células T, células natural killer, neutrófilos e principalmente por macrófagos<sup>35, 37</sup>.

O TNF –  $\alpha$  é libertado pela membrana das células que o segregam através da *enzima conversora do TNF –  $\alpha$*  (TACE). Além disto, a actividade do TNF –  $\alpha$  é mediada pela ligação a receptores membranares, como o *p55* e o *p75 – TNFR*, que se encontram nas diferentes células (Figura 6). Desta forma, uma molécula de TNF –  $\alpha$  deve ligar-se a um ou mais TNFRs, para que se inicie a transdução de sinal intracelular. A sua actividade é regulada pela produção de TNFRs solúveis que tornam o TNF –  $\alpha$  biologicamente indisponível, impedindo a sua ligação aos seus receptores, expressos nas membranas celulares.

Inicialmente, e como sugere o próprio nome, o TNF –  $\alpha$  foi descrito como indutor da necrose de células tumorais, porém, hoje em dia, é reconhecido como uma importante citocina pró – inflamatória, de largo espectro de acção, sendo responsável pela mobilização de neutrófilos ao local de lesão, quer através da indução da expressão de moléculas de adesão à parede endotelial, quer pela promoção de síntese de outras citocinas pró – inflamatórias, e pelo aumento da permeabilidade microvascular<sup>37, 38</sup>. E existem, de facto, dados histológicos de resposta inflamatória, em que se verifica marginalização de neutrófilos no pulmão transplantado, simultaneamente com níveis de TNF –  $\alpha$  elevados.<sup>39</sup> Assim como Khimenko *et al* demonstraram que o TNF –  $\alpha$  promove a expressão de moléculas de adesão celular, como a ICAM – 1, E – selectina e VCAM – 1, em células endoteliais da aorta em modelos humanos<sup>40</sup>. Além destes, outros estudos revelaram que a exposição dos neutrófilos ao TNF –  $\alpha$  resultou em níveis aumentados de anião superóxido, aumento da agregação e adesão dos neutrófilos às células endoteliais, libertação de leucotrieno B<sub>4</sub> e promoção da fagocitose sendo, cada um destes efeitos, relevante para o processo de lesão endotelial alveolar mediado pelos neutrófilos, que se observa na lesão pulmonar causada por I/R.<sup>38</sup>

Por outro lado, outras investigações sugerem que o TNF –  $\alpha$  altera a selectividade da membrana endotelial e produz edema pulmonar, segundo um mecanismo que poderá contar com a participação do factor de activação plaquetária e do tromboxano A<sub>2</sub>.<sup>40, 41</sup> De acordo com esta hipótese, foi também demonstrado que o TNF –  $\alpha$  aumentava a resistência vascular pulmonar que resulta em edema alveolar, como resultado da libertação de tromboxano A<sub>2</sub>, subsequente à activação de leucócitos polimorfonucleares.<sup>41</sup>

Finalmente, mas igualmente importante, vários resultados enfatizam o papel do TNF –  $\alpha$  no período inicial da lesão de reperfusão pulmonar, visto que a estimulação da produção de TNF –  $\alpha$ , pelos macrófagos, é rapidamente seguida de transcrição, tradução e libertação deste, num curto espaço de tempo (aproximadamente 30 minutos de reperfusão).<sup>24, 37, 38</sup>



**Figura 6** – Mecanismo de acção intracelular do factor de necrose tumoral –  $\alpha$ . (Adaptado de <http://www.asma-bronquica.com.br/medical/TNF.html>)<sup>42</sup>

## II.VI.I.II – Interleucinas

As interleucinas (IL) compõem um grande grupo de citocinas e são produzidas principalmente por células T, embora algumas sejam sintetizadas também por macrófagos e pelas células dos próprios tecidos. As interleucinas possuem uma variedade de funções, mas a maioria delas encontra-se envolvida na indução da divisão de outras células. Cada uma das interleucinas actua sobre um grupo limitado de células, que expressam receptores com os quais interagem. Entre um vasto numero de interleucinas as IL – 1, IL – 8, IL – 10, IL – 12 e IL – 18 são as mais importantes no âmbito da lesão de I/R. No entanto, ao contrário das restantes interleucinas, a IL – 10, possui uma actividade anti – inflamatória, pelo que não será referida nesta secção.

A *interleucina – 1 (IL – 1)* é um grupo de três polipéptidos: *interleucina – 1 $\alpha$  (IL – 1 $\alpha$ )*, a *interleucina – 1 $\beta$  (IL – 1 $\beta$ )* e *antagonista do receptor da interleucina – 1 (IL – 1RA)*, que desempenham um papel central na regulação das respostas imunes e inflamatórias e são produzidas por uma grande variedade células.<sup>43</sup> A IL – 1 desencadeia um conjunto de

alterações nas células endoteliais, entre elas a produção de prostaglandinas, factor de activação plaquetário, moléculas de adesão e linfocinas (citocinas produzidas pelos linfócitos).<sup>43</sup>

No contexto da lesão de I/R, a atenção incide essencialmente na IL – 1 $\beta$ . Esta apresenta funções muito semelhantes ao TNF –  $\alpha$ , como sejam as propriedades quimioatractoras de leucócitos, estimulação fagocitária, promoção da expressão de outras citocinas e quimiocinas, além dos seus efeitos no crescimento e morte celular.<sup>37</sup> Chang *et al* observaram ainda que a expressão do gene da IL – 1 $\beta$  sofre um aumento acentuado na fase inicial de reperfusão pulmonar, evidenciando um padrão de expressão muito semelhante ao do TNF –  $\alpha$ , o que permite inferir uma provável contribuição desta interleucina na lesão pulmonar de I/R<sup>43</sup>. Da mesma forma, Krishnadasan *et al* observaram que ambos, TNF –  $\alpha$  e IL – 1 $\beta$ , são expressos numa fase inicial da reperfusão, embora o pico de expressão da IL – 1 $\beta$  seja posterior à do TNF –  $\alpha$ <sup>37</sup>.

A interleucina – 8 (IL – 8) é um polipéptido pertence à família das citocinas quimiotácticas – *quimiocinas*, que são responsáveis pela quimiotaxia e activação de neutrófilos e de outras células, como monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos, aos locais de inflamação. Além das suas actividades quimiotácticas, a IL – 8 induz a libertação de enzimas lisossomais pelos neutrófilos, assim como a adesão destes ao endotélio vascular, pois induz o aumento da expressão de ICAM – 1 e VCAM – 1.<sup>35,44</sup>

A síntese, não constitutiva, de IL – 8 tem sido observada, *in vitro*, numa variedade de células (monócitos, linfócitos T, neutrófilos, células endoteliais...), em resposta a diversos estímulos, entre os quais, IL – 1 e TNF –  $\alpha$ . Ao que parece, após a libertação dessas citocinas a expressão de IL – 8 e de E – selectina é aumentada, sendo que a IL – 8 se liga à superfície da célula endotelial activada e activa os neutrófilos.<sup>45</sup> Na lesão de I/R pulmonar, especificamente, existem dados histológicos que demonstram que, nos pulmões, as células que produzem IL – 8 são, maioritariamente, células ciliadas dos bronquíolos e macrófagos alveolares, indiciando que a IL – 8 é produzida localmente.<sup>44</sup> Existem também algumas evidências de que as espécies reactivas de oxigénio podem regular a produção de IL – 8 que, por seu turno, induz a geração de iões superóxido, que contribuem para a progressão da lesão de I/R.<sup>44</sup>

Perrot *et al* estudaram o comportamento de várias citocinas num modelo de transplante pulmonar em humanos, e apuraram que os níveis de IL – 8 aumentavam gradualmente ao

longo tempo, durante o tempo de I/R, e que os doentes que faleceram, devido a lesão de I/R, apresentavam níveis de IL – 8 bastante mais elevados que os restantes, concluindo, portanto, que os níveis de IL – 8 se relacionam, inversamente, com a função do órgão transplantado. No entanto, a IL – 8 também se revelou importante nos doentes que manifestaram formas de lesão de reperfusão menos agressivas, pois os seus níveis aumentaram após a reperfusão e correlacionaram – se, significativamente, com a função do pulmão.<sup>36</sup>

As *interleucinas 12 e 18 (IL – 12 e IL – 18)* têm funções muito semelhantes, de tal forma que operam em conjunto na indução na imunidade celular, sendo que seu principal papel, é estimular a produção de IFN –  $\gamma$ .<sup>35</sup>

### **II.VI.I.III – Interferão - $\gamma$**

O interferão –  $\gamma$  (IFN –  $\gamma$ ), produzido, principalmente, pelas células T activadas e pelas células *natural killer*, desempenha um papel importante na imunidade inata e adaptativa. É um factor de inibição da migração dos macrófagos, pelo que promove a sua adesão ao endotélio vascular, através da *upregulation* de moléculas de adesão leucocitária. O IFN –  $\gamma$ , juntamente com o TNF –  $\alpha$ , vão também induzir os macrófagos a aumentar a sua capacidade fagocítica e o seu metabolismo oxidativo, contribuindo para a lesão da vasculatura pulmonar e do epitélio brônquico.<sup>35,39</sup>

O IFN –  $\gamma$  é também um potente indutor da expressão dos complexos MHC, pelo que tem um papel importante no fenómeno de rejeição, nomeadamente, após o transplante pulmonar.<sup>39</sup>

### **II.VI.II – Endotelinas**

As endotelinas são mediadores pró – inflamatórios, produzidos por uma grande variedade de células, com propriedades vasoconstritoras, de especial importância na patofisiologia pulmonar.<sup>19</sup>

Neste contexto, a *endotelina – 1*, é a mais estudada, devido ao seu potente efeito broncoconstritor nas células endoteliais e epiteliais pulmonares, onde é predominantemente

expressa. Este efeito vasoconstritor pulmonar traduz-se no aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, na formação de edema pulmonar, que caracteriza a lesão pulmonar induzida pela I/R. Entre outros efeitos da endotelina – 1 contam-se a estimulação da produção de citocinas pelos macrófagos e monócitos e a promoção da retenção de neutrófilos no pulmão.<sup>19, 46</sup>

Estudos clínicos e experimentais têm mostrado que a expressão de endotelina – 1 se encontra significativamente aumentada, antes e durante as primeiras horas após a reperfusão, o que confirma a participação deste mediador na patofisiologia da lesão pulmonar de reperfusão.<sup>19</sup>

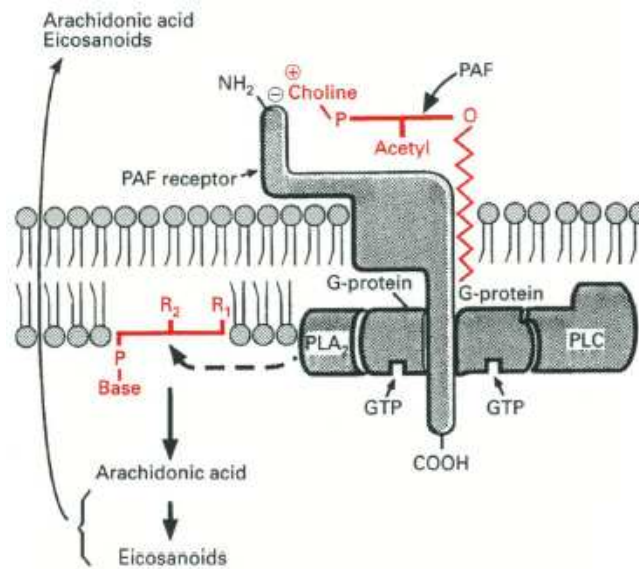
Também os receptores da endotelina – 1, *ETA* e *ETB*, são expressos no tecido pulmonar, sendo que os efeitos pró – inflamatórios da endotelina – 1 advêm da sua interacção com estes receptores.<sup>46</sup>

### **II.VI.III – Moléculas Lipídicas**

A lesão celular, subsequente à I/R pulmonar, é caracterizada pela destabilização das membranas lipídicas, com a conseqüente formação de lípidos bioactivos.

A fosfolipase *A*<sub>2</sub>, detectada em vários processos inflamatórios, é responsável pela geração desses mediadores lipídicos. Assim, a fosfolipase *A*<sub>2</sub> induz a produção de PAF e mobiliza o ácido araquidónico, dos fosfolípidos da membrana, para que dê início à síntese dos eicosanóides. A cascata do ácido araquidónico divide-se em duas vias distintas: a via da 5 – lipoxigenase e a via da cicloxigenase, que culminam na formação de leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos, que participam nos processos patofisiológicos da lesão pulmonar de I/R.<sup>19</sup>

O *factor de activação plaquetária (PAF)* é um mediador pró – inflamatório fosfolipídico que pode ser libertado por uma variedade de células, incluindo macrófagos, plaquetas, células endoteliais, mastócitos e neutrófilos. Entre os seus efeitos biológicos contam-se a activação das células endoteliais, com a conseqüente expressão de moléculas de adesão, a produção de citocinas e de eicosanóides, que ocorre através da activação do *receptor do factor de activação plaquetária (PAFR)* que se encontra acoplado a uma proteína G (Figura 7).<sup>47 - 49</sup>



**Figura 7** – Interação entre o factor de activação plaquetário e seu receptor. (Adaptado de Chao *et al*)<sup>49</sup>

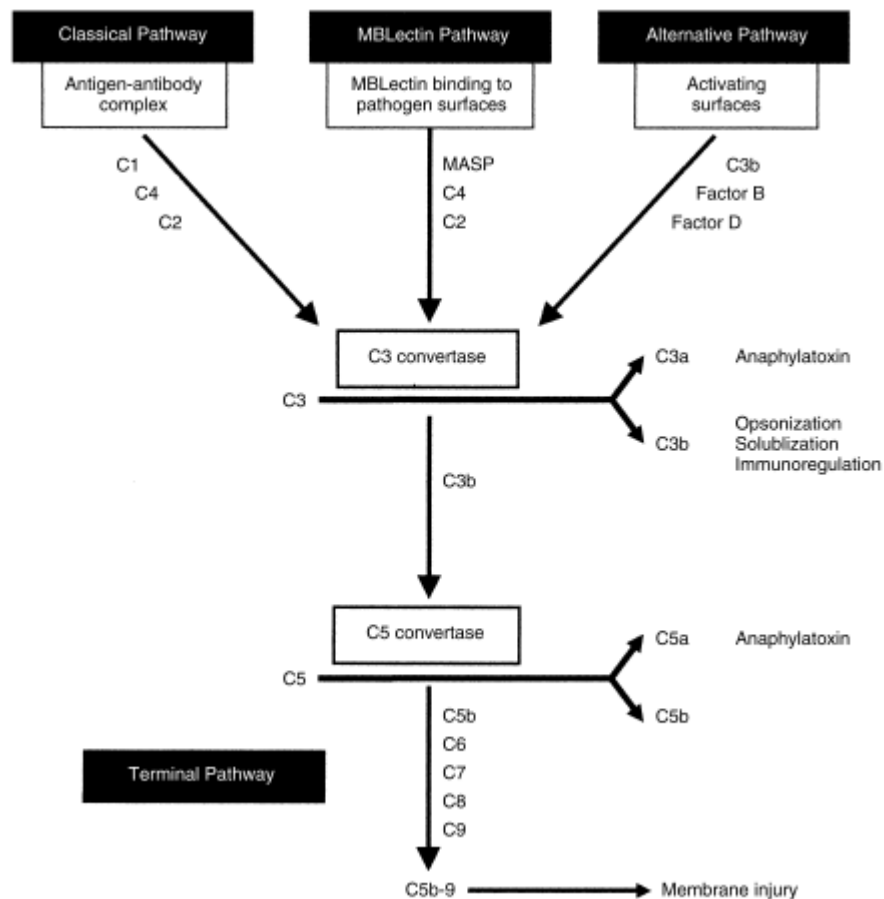
Os *leucotrienos*, formados na via da 5 – lipoxigenase, são libertados pelos mastócitos e são responsáveis por muitos dos sintomas associados à lesão de I/R. Os *leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub>* estão envolvidos na regulação da permeabilidade vascular e na consequente formação de edema pulmonar, característica da lesão pulmonar de I/R. O *leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)*, por seu lado, actua no processo de acumulação leucocitária, adesão ao endotélio vascular, migração dos leucócitos da corrente sanguínea para os locais de inflamação, desgranulação e libertação de enzimas lisossomais, bem como na produção de espécies reactivas de oxigénio.<sup>50, 51</sup>

Os tromboxanos, mais concretamente, o *tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)*, tem sido amplamente estudado, no âmbito da lesão pulmonar de reperfusão, devido às suas propriedades pró – inflamatórias e vasoconstritoras pulmonares. Klausner *et al*, num modelo experimental de lesão pulmonar por I/R de tecidos à distância, sugerem que a isquémia do tecido determina a produção de TXA<sub>2</sub>, pelos leucócitos, sendo esta produção intensificada após a reperfusão.<sup>52</sup> Assim, o TXA<sub>2</sub> que se forma aumenta a permeabilidade dos capilares pulmonares, por meio de uma acção directa sobre a célula endotelial e pelo aumento da adesão e diapedese dos leucócitos. Esta alteração de permeabilidade promove edema pulmonar, que é intensificado pela função vasoconstritora do TXA<sub>2</sub>.<sup>1</sup>

## II.VI.IV – Sistema do Complemento

Para compreender a contribuição do complemento na lesão de I/R do pulmão, é importante conhecer o seu funcionamento.

O complemento é constituído por um grupo de 20 proteínas, denominadas de C1 a C9, e pelos factores B, D e P. Geralmente, as proteínas do complemento circulam no sangue na sua forma inactiva (não funcional). O sistema do complemento subdivide-se em três vias: clássica, alternativa e da lectina (Figura 8) e é através destas vias que a cascata do complemento é activada, por meio de clivagens proteolíticas e associação de moléculas precursoras. No entanto, a forma como o sistema do complemento funciona é independente da via pela qual foi activado.<sup>53, 54</sup>



**Figura 8** – Cascata do Complemento.

(Adaptado de [http://www.nature.com/ki/journal/v59/n4/fig\\_tab/4492147f1.html](http://www.nature.com/ki/journal/v59/n4/fig_tab/4492147f1.html))<sup>55</sup>

Como ilustra a Figura 8, a activação da via clássica, que integra o sistema imunitário adaptativo, ocorre por meio da interacção de complexos antigénio/anticorpo com a primeira proteína do complemento, *C1*, resultando na formação da proteína activada, *C1q*, que se liga à porção Fc da imunoglobulina, promovendo a activação das esterases *C1r* e *C1s*, sub – componentes da *C1*, necessárias para a progressão da activação da cascata. O passo seguinte é a clivagem das proteínas *C2* e *C4*, pela *C1s*, formando *C2a* e *C2b*, *C4a* e *C4b*, respectivamente. A *C4a* adere à membrana celular, por meio de uma ligação tioéster, e a *C2a* permanece ligada a *C4a*, na presença de iões  $Mg^{2+}$ , originando *C4b2a*, também denominada *C3 – convertase da via clássica*. Esta, por sua vez, cliva a *C3* em *C3a* e *C3b* que, ao ligar-se à *C4b2a*, forma a *C4b2a3b* (*C5 – convertase*).<sup>54,56,57</sup>

A activação da via alternativa, independente de anticorpos, ocorre através de vários mecanismos, tais como a presença de lipopolissacáridos (constituintes das membranas de diversas bactérias), de proteínas da superfície viral e de parasitas, biomateriais (bypass cardiopulmonar), etc.<sup>54, 56, 57</sup>. Esta via pode também ser activada mediante a ligação da proteína *C3b* (originada a partir da clivagem espontânea da *C3*) à superfície membranar de microrganismos invasores<sup>56</sup>. A este complexo *C3b – superfície membranar* vai ligar-se, na presença de iões  $Mg^{2+}$ , o *factor B*, dando origem à proteína *C3bB*, que é clivada pelo *factor D*, culminando na formação da *C3bBb*. Esta sofre ainda a agregação de uma molécula de properdina (*factor P*), originando *C3bBbP*, também denominada de *C3 – convertase de amplificação da via alternativa* que, como a própria designação indica, pode participar na conversão de outras moléculas *C3* em *C3a* e *C3b*, sendo que esta última pode funcionar como substrato para a fase inicial desta via ou, por outro lado, ligar-se ao complexo *C3bBb* para formar *C3bBb* (*C3b*), denominada *C5 – convertase da via alternativa*.<sup>56,57</sup>

Além destas duas vias principais, existe ainda a via da lectina, também independente de anticorpos. A principal componente desta via é uma proteína homóloga da *C1q*, a *mannose – binding lectin* (MBL). A *MBL* reconhece a manose presente na superfície da membrana de microrganismos invasores e liga-se a outras proteínas, *MASP – 1* e *MASP – 2* (*mannose associated serine protease*), que funcionam como convertases, ou seja, clivam a *C2*, *C3* e *C4*, conduzindo à formação das *C3 –* e *C5 – convertases*, segundo o mecanismo descrito anteriormente, na via clássica.<sup>54,57</sup>

Alcança-se assim um ponto comum da cascata do complemento, a partir do qual a cascata prossegue segundo um tronco – comum: a formação da proteína *C5 – convertase*, responsável pela clivagem da *C5* em *C5a* e *C5b*<sup>54</sup>. A junção da *C5b* com as proteínas *C6*, *C7*,

C8 e C9 forma o *complexo de ataque membranar (MAC ou C5b – C9)* que permanece “ancorado” à parede celular do microrganismo<sup>56</sup>. Em seguida, são adicionadas mais proteínas C9, formando um canal na membrana por onde pode ocorrer a saída de material citoplasmático e/ou entrada de substâncias, conduzindo à lise osmótica<sup>56, 58</sup>. Em situação normal, as células metabolicamente activas possuem mecanismos de defesa que as protegem da acção do MAC. No entanto, a ocorrência de I/R pode comprometer essas defesas, tornando as células endoteliais, entre outras, vulneráveis à acção do complemento.<sup>58</sup>

A activação do sistema do complemento ocorre numa fase inicial da lesão de I/R, gerando mediadores pró – inflamatórios, como os radicais livres de oxigénio, neutrófilos e produtos resultantes da activação do endotélio, que podem alterar a homeostase vascular e interferir com outros factores<sup>10, 54</sup>. A própria localização do endotélio na interface sangue/tecido faz dele um potencial alvo para os oxidantes produzidos pelas próprias células endoteliais ou pelos leucócitos activados pela resposta inflamatória. Embora, o mecanismo exacto pelo qual o complemento é activado na lesão pulmonar de I/R permaneça incógnito, supõe-se que terá o envolvimento de espécies reactivas de oxigénio. Segundo esta hipótese, os radicais livres de oxigénio, como o peróxido de hidrogénio (proveniente da desgranulação dos neutrófilos), convertem a C5 numa forma activa do tipo C5b –, mediante uma via não enzimática. Além disso, a inibição da formação de espécies reactivas de oxigénio diminui a activação e deposição do complemento<sup>54, 58</sup>.

Os componentes do complemento descritos como sendo biologicamente activos são as proteínas C3a, C4a e C5a, denominadas anafilotoxinas, a *iC3b* (*C3b* inactivada) e o MAC<sup>10, 54</sup>.

Entre as anafilotoxinas supracitadas, a C3a e a C5a têm sido referenciadas como as proteínas de maior relevância na lesão de I/R, uma vez que são mediadores pró – inflamatórios extremamente potentes. Assim, de uma forma geral, estas proteínas induzem vasoconstrição, aumentam a permeabilidade vascular e estimulam a desgranulação dos granulócitos e mastócitos, com a consequente libertação de histamina, peróxido de hidrogénio, citocinas, entre outros mediadores inflamatórios. No entanto, a C5a é 10 a 100 vezes mais potente que a C3a<sup>58</sup>, e pode promover a adesão e activação dos neutrófilos, fazendo com que libertem moléculas de adesão celular, citocinas, produtos do metabolismo do ácido araquidónico, etc., e activar as células endoteliais<sup>10, 54, 58</sup>. Na base destas conclusões, estão diversos estudos realizados em modelos de I/R de diferentes órgãos e animais. Em 1995,

Ivey *et al*, num modelo de I/R do miocárdio em coelhos, depararam-se com um aumento da concentração de C5a poucos minutos após o início da reperfusão, e formularam a hipótese de que a C5a poderia ser responsável pela mobilização inicial de neutrófilos ao local de inflamação, indiciando o possível envolvimento desta proteína na lesão de I/R<sup>59</sup>. Alguns anos mais tarde, outros estudos realizados, em modelos de I/R intestinal e do miocárdio, demonstraram que o bloqueio das proteínas C5 e C5a, assim como a utilização de anticorpos anti – C5 e anti – C5a, resultaram na protecção ou redução da lesão de I/R e redução da infiltração de neutrófilos e disfunção endotelial, confirmando, mais uma vez, a intervenção da C5 e da C5a na lesão de I/R<sup>10, 57, 60</sup>. Embora, existam muitos estudos realizados com o objectivo de clarificar o mecanismo de actuação desta proteína, poucos são efectuados com modelos de I/R do pulmão. Contudo, Mulligan *et al* utilizaram um modelo de lesão pulmonar em ratos e comprovaram o papel da C5a na indução da produção de citocinas e de moléculas de adesão<sup>61</sup>. Desta forma, as conclusões obtidas em modelos de I/R intestinal e do miocárdio parecem ser também aplicáveis à I/R pulmonar.

A C3a, por sua vez, não tem sido alvo de tantos estudos como a C5a, quer no pulmão, quer noutros órgãos, provavelmente devido à falta de moléculas potentes e selectivas que interajam com o seu receptor<sup>60</sup>. Todavia, foram realizados alguns estudos que comprovaram o poder quimiotáctico da C3a para eosinófilos, macrófagos e mastócitos<sup>62, 63</sup>. Stahl *et al*, com um modelo de I/R intestinal em ratinhos, observou uma acumulação de C3 no pulmão, depois da I/R intestinal, comprovando a contribuição desta proteína na lesão pulmonar provocada por I/R de órgãos à distância<sup>64</sup>. Da mesma forma, Williams *et al*, utilizando ratinhos *knock out* para as proteínas C3 e C4, constatou que estes animais auferiam protecção contra a lesão de I/R intestinal<sup>65</sup>.

Para as proteínas C3a e C5a exercerem as funções acima citadas, os leucócitos e o endotélio vascular expressam receptores, C3aR e C5aR, respectivamente, com os quais estas proteínas interagem. A interacção da C3a e da C5a com os respectivos receptores desencadeia uma cascata de transdução de sinal, dependente de uma proteína G heterodimérica que, pode activar cascatas de sinalização, envolvendo, por exemplo, o AMP cíclico, a fosfolipase C, o íão  $\text{Ca}^{2+}$  ...<sup>66</sup>

Finalmente, mas não menos importante, o MAC, como descrito anteriormente, provoca a lise celular quando se forma uma grande quantidade de poros na membrana da célula. No

entanto, uma baixa densidade de poros na superfície celular pode provocar alterações na actividade da célula, nomeadamente, alteração da expressão de moléculas de adesão celular, como, VCAM-1, ICAM-1 e selectinas e estimulação da secreção de citocinas, através da activação do factor de transcrição nuclear, NF –  $\kappa$ B.<sup>67</sup> A formação destes poros nas células do endotélio vascular, altera a permeabilidade das células endoteliais, permitindo a entrada de substâncias tóxicas, como por exemplo, espécies reactivas de oxigénio, que podem conduzir a alterações na regulação do tónus vascular.<sup>68</sup>

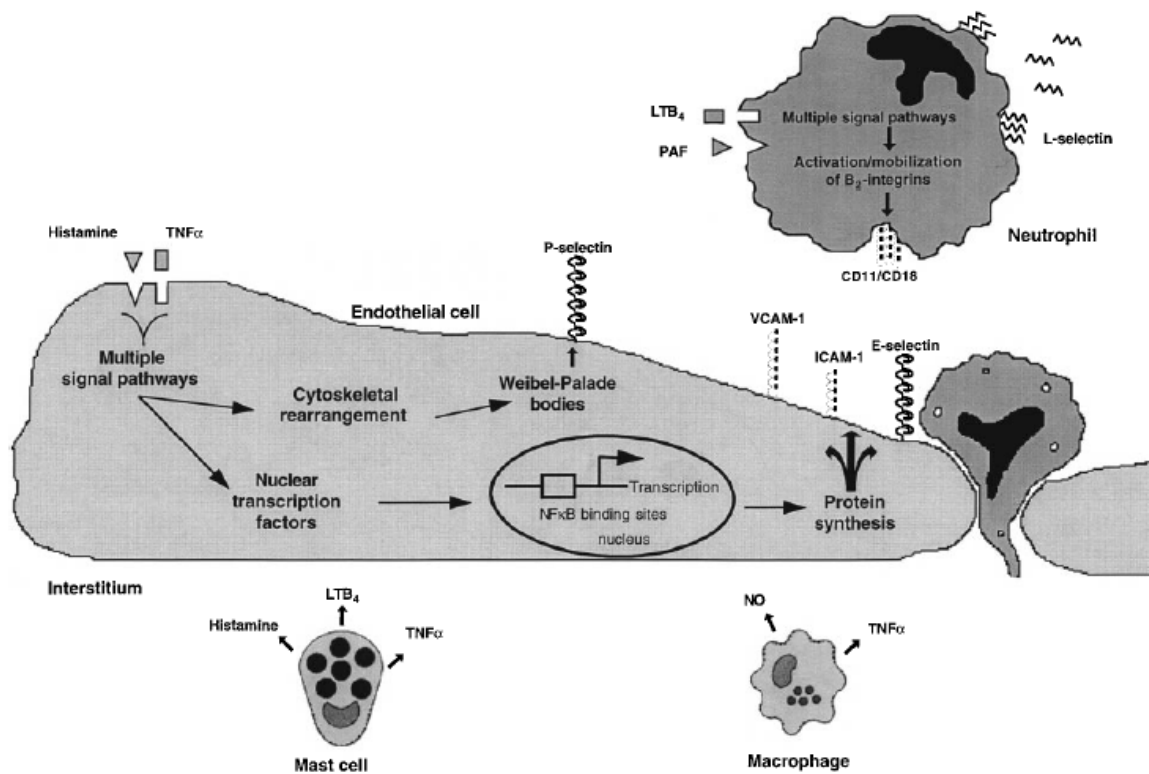
Por conseguinte, são necessários mecanismos de regulação desta cascata, evitando a formação de MAC's nas células endógenas e a formação excessiva de mediadores da inflamação. Desta forma, existem reguladores presentes no plasma e mediadores membranares. Entre os mediadores plasmáticos estão o factor I, factor H, carboxipeptidase N e o inibidor da proteína C1 (C1INH). O *factor I* promove a inactivação da C4b e C3b, através da sua clivagem, com a *C4 – binding protein* (C4BP) como cofactor (via clássica e via da lectina), e a degradação das C3 – e C5 – convertases juntamente com o *factor H* (via alternativa). A *carboxipeptidase N*, por sua vez, inactiva as proteínas C3a, C4a e C5a. Finalmente, o *C1 – INH* inibe a C1r, C1s e as MASP's.<sup>54, 57</sup> Os mediadores membranares, como o *receptor tipo 1 do complemento* (CRI/CD35), *membrane cofactor protein* (MCP/CD46), e o *decay accelerating factor* (DAF/CD55), actuam como cofactores do *factor I*, facilitando a degradação das convertases, assim como da C3b e C4b<sup>57</sup>.

## II.VII – Adesão Leucocitária

A cascata de adesão é regulada por uma variedade de factores físicos e químicos que actuam ao nível dos leucócitos e células endoteliais. Durante a isquémia e reperfusão, esses factores pode ser alterados de forma a favorecer a adesão leucocitária.<sup>69</sup> Assim, as etapas que envolvem a adesão, activação e migração leucocitária são mediadas por moléculas de adesão.

Após a lesão inicial, os macrófagos e mastócitos são estimulados, por exemplo, pelo sistema do complemento, a libertar mediadores, como histamina, ROS, factor de activação plaquetário (PAF), leucotrienos e citocinas. A ligação de histamina e leucotrienos aos seus receptores, nas células endoteliais, resulta no aumento da expressão de *P – selectina*, na superfície endotelial que, por sua vez, vai interagir com o respectivo receptor, *P – selectin*

*glycoprotein 1 (PSGL - 1)*, expresso nos neutrófilos. No entanto, nesta fase, a afinidade ligando – receptor é baixa, pelo que resulta numa ligação leucócito – endotélio “intermitente”, designada de *leukocyte rolling*. Os leucócitos são então expostos a factores como o PAF, leucotrienos e outros mediadores que, rapidamente, activam e promovem a libertação de *L – selectina* na superfície leucocitária. A libertação de *L – selectina* estimula a expressão e activação de integrinas  $\beta_2$  nos leucócitos, como as CD11a/CD18 e CD11b/CD18, que se ligam às *moléculas de adesão intercelular endotelial – 1 e 2 (ICAM – 1, ICAM - 2)*, expressas pelo endotélio vascular. Desta interacção, resulta uma adesão firme dos leucócitos, assim como a mobilização de outros, originando a agregação leucocitária. De seguida, a transmigração dos leucócitos para o espaço intersticial é auxiliada pela *platelet – endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM - 1)*, constitutivamente expressa ao longo das junções intercelulares do endotélio e também nos leucócitos. Finalmente, para atingirem o compartimento extravascular, estes leucócitos activados libertam substâncias tóxicas - ROS, proteases e elastases, que contribuem para o aumento da permeabilidade microvascular, edema, etc. (Figura 9) <sup>6, 70, 71</sup>



**Figura 9** – Mecanismo de expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e nas células endoteliais, no decurso da resposta inflamatória. (Panés *et al*)<sup>70</sup>

## II.VII.I – Moléculas de adesão

As moléculas de adesão, como o próprio nome indica e conforme demonstrado anteriormente, desempenham um papel fundamental no mecanismo de adesão leucocitária às células endoteliais. Estas subdividem em três famílias principais: selectinas,  $\beta$  – integrinas e imunoglobulinas.

### II.VII.I.I – Selectinas

A família das selectinas engloba a P –, L – e E – selectina. Estas moléculas desempenham um papel crucial na adesão inicial dos leucócitos ao endotélio activado, no local da lesão.

A *P – selectina* é expressa na superfície das células endoteliais activadas e plaquetas e é armazenada nos corpos de Weibel – Palade dessas células. Quando as células endoteliais são estimuladas, por exemplo pela histamina, a *P – selectina* é, em poucos minutos, mobilizada à superfície da célula endotelial activada, sendo depois reciclada, dentro da própria célula ou no plasma. Durante o processo inflamatório, a *P – selectina* endotelial actua na mobilização de leucócitos às vénulas pós – capilares, enquanto a *P – selectina* plaquetária promove à agregação dos mesmos com as plaquetas, formando trombos.<sup>70, 71, 45</sup> No contexto da I/R pulmonar, esta parece ter um papel determinante, pois um estudo realizado num modelo de pulmão de rato mostrou que a inibição da expressão endotelial de *P – selectina*, após a reperfusão do pulmão isquémico, atenuou o aumento da permeabilidade subjacente à lesão de I/R.<sup>69</sup> Além disto, verificaram que a imunoneutralização da *P – selectina* fez com que o número de neutrófilos circulantes, fosse semelhante ao observado antes da isquémia, sugerindo que a mobilização de neutrófilos foi prevenida.<sup>69</sup>

A *L – selectina* é uma glicoproteína constitutivamente expressa na maioria dos leucócitos circulantes, no entanto o seu ligando apenas está presente no endotélio activado<sup>70</sup>. Esta é libertada da superfície dos neutrófilos activados o que limita a capacidade dessas células “deslizarem” ao longo do endotélio<sup>70</sup>. Está também descrito, o papel da *L – selectina*

na migração dos linfócitos para os gânglios linfáticos periféricos e locais de inflamação crónica, e dos neutrófilos para os locais de inflamação aguda <sup>71</sup>.

Por último, a *E – selectina* está confinada às células endoteliais e a sua expressão é regulada por diferentes estímulos, como endotoxinas e citocinas (IL – 1 e TNF –  $\alpha$ ) <sup>70, 71</sup>. Eppihimer *et al* demonstraram que a expressão de *E – selectina* é detectada 2h após a estimulação da endotoxina, retornando aos valores normais após 8h. Pelo contrário, a *P – selectina* apresenta um pico mais tardio (cerca de 5h) mas os seus níveis aumentados de expressão mantêm-se por, aproximadamente, 12h. <sup>72</sup>

Simplificando, a *P – selectina* é expressa logo numa fase inicial da lesão de I/R, ao passo que a *L –* e a *E – selectina* surgem numa etapa mais tardia do processo de inflamação.

## II.VII.I.II – Integrinas

As integrinas são proteínas heterodiméricas constituídas por duas subunidades:  $\alpha$  e  $\beta$ . <sup>1</sup>  
<sup>45</sup> Estas são expressas na superfície dos leucócitos, onde podem mediar a adesão leucócito – célula endotelial. As integrinas encontram – se agrupadas em subfamílias, dependendo da sua especificidade, sendo que a subfamília  $\beta_2$  é a mais relevante no processo de adesão leucocitária. A subfamília  $\beta_2$  contém uma das quatro cadeias  $\alpha$  – CD11a, CD11b, CD11c ou CD11d, que estão acopladas a uma cadeia  $\beta$  comum – CD18. A activação destas moléculas por mediadores inflamatórios, entre eles, o PAF e citocinas, como o TNF –  $\alpha$ , provoca uma amplificação na expressão das integrinas na superfície leucocitária. <sup>1</sup>

O heterodímero *CD11a/CD18* é expresso na maioria dos leucócitos e interage com as ICAM – 1 e ICAM – 2, apresentadas pelas células endoteliais, o que resulta numa adesão firme leucócito – endotélio. <sup>1</sup>

As integrinas *CD11b/CD18* e *CD11c/CD18*, expressas pelos granulócitos e monócitos, são armazenados em grânulos e mobilizados à superfície celular aquando da activação dos leucócitos. A *CD11b/CD18* interage com a ICAM – 1, enquanto o ligando para a *CD11c/CD18* não se encontra ainda bem estabelecido. <sup>1</sup>

Embora com uma função mais discreta, a subfamília  $\beta_1$  também colabora na mobilização de diferentes população de leucócitos. Assim, a  $\beta_1$  – integrina,  $\alpha_4 \beta_1$ , também designada como *very late antigen – 4* (*VLA – 4*), intervém na adesão dos linfócitos,

monócitos, eosinófilos e células *natural killer* às células endoteliais, que expressam a *molécula de adesão celular vascular* (VCAM – 1) (Figura 9).<sup>1</sup>

Neste contexto, Welbourn *et al*, num modelo de lesão pulmonar após I/R do tronco inferior, em ratos submetidos a 3h de isquémia, demonstraram a participação do complexo CD18 na interacção leucócitos – endotélio. E a utilização de um anticorpo monoclonal anti – CD18 impediu a acumulação de leucócitos nos pulmões e formação de edema pulmonar.<sup>73</sup>

Resultados equivalentes foram descritos por Hill *et al*, em que a administração de um anticorpo monoclonal anti – CD11b/CD18 diminuiu a lesão pulmonar após isquémia – reperfusão intestinal. No entanto, a acumulação de leucócitos nos pulmões não foi evitada.<sup>1</sup> Similarmente, Moore *et al* procederam à imunoneutralização do CD – 18 em ratos e presenciaram a redução da permeabilidade capilar, e da retenção de neutrófilos nos pulmões.<sup>69</sup>

Logo, apesar de detectar a participação das integrinas na adesão leucocitária, a real contribuição destas moléculas, na lesão pulmonar causada por I/R de tecidos à distância, não está ainda totalmente definida.<sup>1</sup>

### II.VII.I.III – Imunoglobulinas

De entre a superfamília das imunoglobulinas apenas algumas actuam como moléculas de adesão, sendo elas a ICAM – 1, ICAM – 2, VCAM – 1 e PECAM – 1.

A *ICAM – 1* encontra-se na superfície das células endoteliais e a sua expressão, embora constitutiva, pode ser significativamente aumentada pelas citocinas (TNF –  $\alpha$ , IL – 1, IFN –  $\gamma$ ). Por exemplo, no pulmão, onde a expressão constitutiva é alta, o aumento é reduzido, ao passo que noutros tecidos, em que a expressão constitutiva é baixa, o aumento da expressão é bem mais significativo.<sup>70, 45</sup>

De forma análoga, a *ICAM – 2* também é constitutivamente expressa nas células do endotélio vascular, embora a sua expressão não seja influenciada pelo nível de activação da célula endotelial.<sup>70, 45</sup>

Como previamente referido, as *ICAM – 1* e – 2 são ligandos das integrinas –  $\beta_2$ , sendo que a *ICAM – 2* apresenta menor afinidade para a CD11a/CD18 que a *ICAM – 1*.<sup>70</sup>

No que respeita à *VCAM – 1*, que se liga à  $\chi^4 \beta 1$ , esta intervém na angariação de monócitos e linfócitos ao local da lesão. Embora também seja constitutivamente expressa, o

seu nível de expressão é muito mais baixo que o da ICAM – 1, 5 a 9 horas após a estimulação pelas citocinas, a densidade de VCAM – 1 nas células endoteliais aumenta significativamente.

70

Por fim, a PECAM – 1 medeia a adesão das plaquetas e dos leucócitos ao endotélio vascular, por meio de interações homofílicas, bem como a migração dos leucócitos através das células endoteliais e através da membrana basal perivascular. Neste caso, a expressão não é regulada pelas citocinas, o PECAM – 1 é redistribuído para a fronteira das células endoteliais adjacentes, onde participa nas interações entre as células endoteliais, que provocam um aumento da permeabilidade vascular, facilitando a transmigração dos leucócitos.<sup>70, 45</sup>

## II.VII.II – Síntese e regulação da expressão de moléculas de adesão

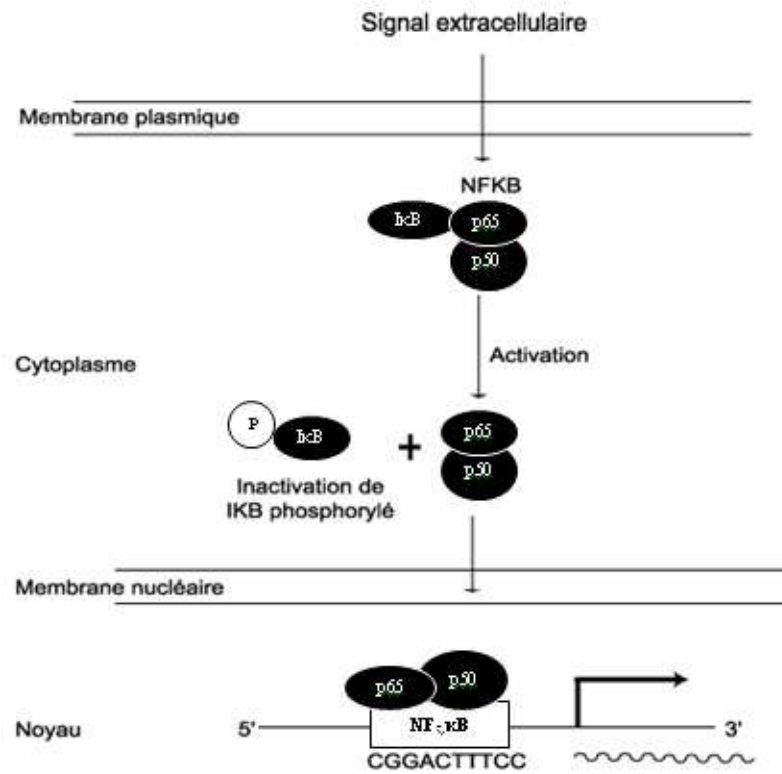
Como já foi demonstrado, as moléculas de adesão desempenham um papel fulcral na resposta inflamatória. Contudo, estas também são alvo de regulação por parte de outros factores, igualmente importantes no processo.

### II.VII.II.I – Factor Nuclear – $\kappa$ B

Entre esses factores de transcrição, o mais importante e mais comumente referido é o *factor nuclear* –  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). E a sua função no contexto do processo inflamatório passa pela sua capacidade de regulação da produção de citocinas pró – inflamatórias e pela *upregulation* da expressão de moléculas de adesão. Entre os genes que codificam mediadores pró – inflamatórios e contêm elementos promotores regulados por membros da família dos factores de transcrição NF- $\kappa$ B contam-se a E – selectina, ICAM – 1, VCAM – 1, IL – 6 e a IL – 8.<sup>66</sup>

Estruturalmente, o NF- $\kappa$ B é composto por duas subunidades, p50 e p65. Quando as células se encontram inactivas, as subunidades estão ligadas, no citoplasma, a uma proteína inibidora, a I –  $\kappa$ B $\alpha$ . Quando a célula é estimulada, por exemplo, por citocinas, espécies reactivas de oxigénio, etc., a I –  $\kappa$ B $\alpha$  é fosforilada e degradada proteoliticamente, permitindo a libertação de NF- $\kappa$ B e a sua translocação do citoplasma para o núcleo da célula, onde este se

liga a elementos promotores específicos e activa os genes alvo, conduzindo, posteriormente, à síntese de proteínas (Figura 10).<sup>70</sup>



**Figura 10** – Mecanismo de activação da transcrição mediado pelo factor nuclear – κB. (Adaptado de [imgt.cines.fr/textes/IMGTEducation/Tutorials/Cancer/\\_FR/Oncogene/IκB.html](http://imgt.cines.fr/textes/IMGTEducation/Tutorials/Cancer/_FR/Oncogene/IκB.html))<sup>74</sup>

### **III – Abordagens farmacológicas da lesão pulmonar induzida por isquemia – reperfusão**

Como já referido anteriormente, o transplante pulmonar é a situação clínica que melhor representa a ocorrência da lesão de isquemia – reperfusão do pulmão. Dado que este procedimento se tem revelado benéfico e é cada vez mais utilizado na terapêutica de muitas doenças pulmonares crónicas, torna-se indispensável a optimização de abordagens farmacológicas que permitam reduzir os efeitos nefastos da lesão de I/R pulmonar, que caracteriza este tipo de transplantes.

Embora existam algumas terapêuticas já utilizadas na prática clínica, como o surfactante pulmonar, os corticosteróides e a ventilação, a maioria das abordagens farmacológicas encontram-se ainda em fase de investigação.

#### **III.I – Surfactante pulmonar**

O surfactante pulmonar, sintetizado e armazenado pelos pneumócitos tipo II, faz parte das defesas pulmonares, actuando na prevenção da atelectasia, após a expiração, e do edema alveolar. Assim sendo, o surfactante pulmonar consiste numa mistura de fosfolípidos (cerca de 90%) e apoproteínas surfactantes, SP – A, SP – B, SP – C e SP – D.<sup>75</sup> Contudo, vários estudos têm reportado a ocorrência de disfunções no surfactante pulmonar, durante a isquemia e reperfusão pulmonar, referindo que essas alterações poderão ser consequência da inibição do surfactante, por proteínas séricas que infiltram o fluido alveolar.<sup>75, 76</sup> Estas alterações resultam num ciclo vicioso de formação de edema intralveolar e consequente alteração do surfactante, o que, em última instância, conduz ao comprometimento da integridade funcional do pulmão.<sup>75</sup>

Por isso, a administração exógena de surfactante é uma das terapêuticas mais utilizadas, no contexto do transplante pulmonar. E, de facto, estudos clínicos e experimentais têm comprovado que a terapia surfactante provoca uma melhoria da função pulmonar pós – transplante. Kermeen *et al*, num estudo de séries de casos, demonstraram que a administração endobronquial de surfactante contribuía para uma melhoria das trocas gasosas e da taxa de sobrevivência, na lesão de I/R subsequente ao transplante pulmonar.<sup>77</sup> Por outro lado, a terapia surfactante administrada precocemente, no dador, antes do transplante, revela

melhores resultados do que quando administrada apenas no receptor, antes ou imediatamente após a reperfusão.<sup>19</sup>

### **III.II – Ventilação**

No transplante pulmonar, o pulmão passa por um período isquémico, que decorre entre o momento em que é retirado do organismo do dador até ao momento da sua reimplantação e reperfusão, no receptor.

Vários estudos clínicos e experimentais consideram que a manutenção da ventilação, durante esse período de isquémia, contribui para a preservação pulmonar. Assim, têm sido descritos efeitos benéficos como, a redução do edema pulmonar e a manutenção da integridade vascular e do surfactante. O efeito da ventilação como protectora da lesão de I/R pulmonar tem sido demonstrado, independentemente da fracção inspirada de oxigénio; porém, quando esse factor é levado em conta, os dados são controversos. Alguns autores referem melhor função pulmonar pós – isquémia – reperfusão, com concentrações elevadas de oxigénio. Outros, pelo contrário, demonstram que, menores concentrações de oxigénio apresentam efeitos protectores mais acentuados. De facto, Silva *et al* verificaram que a ventilação, com oxigénio a 21%, originou menor lesão de isquémia – reperfusão pulmonar, quando comparada com a ventilação com oxigénio a 100%. No entanto, na utilização concomitante de alopurinol (antioxidante) e ventilação, o grupo ventilado com oxigénio a 100% revelou melhores resultados. Isto sugere que os efeitos deletérios da ventilação com oxigénio a 100%, referidos por alguns autores, se devem, essencialmente, ao stress oxidativo, uma vez que quando este é bloqueado, se observam resultados satisfatórios.<sup>78</sup>

### **III.III – Corticosteróides**

A utilização dos corticosteróides, nomeadamente glucocorticóides, na terapêutica farmacológica da lesão de I/R pulmonar deve-se ao seu efeito de *upregulation* da expressão de genes anti – inflamatórios. Os glucocorticóides activam o *receptor dos glucocorticóides* (GC), no citoplasma, com a formação de homodímeros GR – GR que, por sua vez, se ligam a seqüências específicas do DNA, denominadas *elemento de resposta aos glucocorticóides* (GRE), promovendo a transcrição do gene. Um dos genes – alvo deste processo é o que

codifica a I –  $\kappa B\alpha$ , o que provoca uma amplificação da produção desta proteína e, consequentemente, a sua ligação ao NF- $\kappa B$  activado, no núcleo. A ligação da I –  $\kappa B\alpha$  ao NF- $\kappa B$  activado induz a sua dissociação dos seus locais de ligação ao DNA, e a migração para o citoplasma. Desta forma, a adesão leucocitária é bloqueada, pois a transcrição de moléculas de adesão depende da ligação do NF- $\kappa B$  ao DNA.<sup>70</sup> Vários estudos reportam a inibição da expressão de moléculas de adesão pelos glucocorticóides, nomeadamente, da ICAM – 1, VCAM – 1 e E – selectina.<sup>70</sup>

### III.IV – Pré – condicionamento isquémico

O pré – condicionamento isquémico baseia-se no processo de adaptação biológica, ou seja, de que os tecidos expostos a uma lesão adquirem a capacidade de tolerância a uma lesão subsequente. Baseado neste princípio, o pré – condicionamento isquémico consiste na indução de um breve período de isquémia seguido de um curto período de reperfusão, antes da I/R prolongada.<sup>2,6</sup>

Este procedimento tem sido alvo de vários estudos, em diversas espécies, e tem revelado bons resultados na prevenção da lesão por I/R do pulmão. Li *et al*, num modelo de pré – condicionamento em transplante pulmonar em cães, com 10 minutos de isquémia e 15 minutos de reperfusão, observaram uma melhoria das trocas gasosas, redução do número de neutrófilos e tromboxanos, assim como uma limitação da lesão oxidativa e melhoria da depleção dos níveis de ATP.<sup>79</sup> Soncul *et al* aplicaram o pré – condicionamento isquémico, na forma de 5 minutos de isquémia seguidos de 5 minutos de reperfusão (duas vezes), e verificaram uma diminuição da peroxidação lipídica que, provavelmente, se deve ao desenvolvimento de mecanismos antioxidantes endógenos<sup>80</sup>. Além destas, outras investigações reportaram o aumento da superóxido dismutase (enzima antioxidante), aquando da utilização desta terapêutica.

Mediante estes resultados, parece legítimo concluir que o pré – condicionamento isquémico do pulmão inibe a acumulação e activação de neutrófilos no tecido pulmonar, reduzindo assim a produção de ROS e de tromboxanos e, consequentemente, o consumo de superóxido dismutase<sup>79</sup>.

### **III.V – Hipotermia**

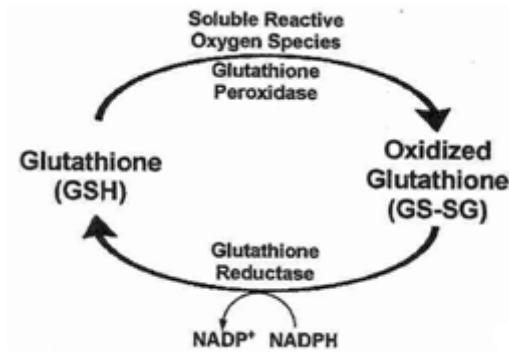
Diversos estudos comprovam que a hipotermia moderada confere protecção contra de lesão de I/R, em diversos órgãos. Quanto à lesão pulmonar de I/R, os resultados obtidos por Shoji *et al* indicam que a diminuição da temperatura, em 3°C, durante o período de isquémia, atenua significativamente a lesão pulmonar de reperfusão, em ratos. Concluíram também que a hipotermia moderada era responsável pela manutenção dos níveis de energia pulmonares (ATP, ADP, AMP), após a reperfusão. Visto que os níveis intrapulmonares destes compostos estão associados com a manutenção das funções pulmonares, a hipotermia moderada pode tornar-se numa via terapêutica, na lesão pulmonar de I/R.<sup>17</sup> Porém são necessários mais estudos para que esta hipótese seja testada em vários modelos animais, por forma a determinar a sua importância, viabilidade e possíveis efeitos adversos desta abordagem terapêutica.

### **III.VI – Terapêutica antioxidante**

A terapêutica antioxidante é uma das abordagens farmacológicas mais promissoras, no âmbito da lesão de I/R pulmonar, pela variedade de vias que levam à formação de espécies reactivas de oxigénio, mas também porque esse é o ponto de partida para a maioria dos mecanismos inflamatórios característicos deste tipo de lesão. No entanto, a maioria dos mecanismos que a seguir se apresentam, apenas têm sido utilizados como forma de demonstrar o envolvimento das ROS, na lesão pulmonar de I/R. Como tal, torna-se necessário desenvolver mais protocolos experimentais que permitam aprofundar o potencial terapêutico destas substâncias antioxidantes.

#### **III.VI.I – N – acetilcisteína**

A *N* – acetilcisteína (NAC) é o antioxidante mais utilizado nos estudos clínicos e experimentais. *In vivo*, a NAC é convertida em L – cisteína, que é utilizada na produção da glutathiona reduzida (GSH).<sup>81</sup> A GSH constitui um dos mecanismos antioxidantes da maioria das células do organismo, uma vez que as ROS são consumidas aquando da sua oxidação (Figura 11).<sup>82</sup>



**Figura 11** – Reacção de oxidação – redução da glutatona.  
(Adaptado de <http://www.benbest.com/nutrceut/AntiOxidants.html>)<sup>83</sup>

A utilização da NAC na prevenção da lesão de I/R pulmonar tem revelado resultados bastante promissores. Inci *et al* recorreram a um modelo de transplante pulmonar em ratos e observaram que a administração de NAC (aos doadores e receptores do órgão) resultou na melhoria da preservação da função pulmonar, aumento dos níveis de GSH e diminuição da peroxidação lipídica. Quando a NAC foi administrada apenas aos receptores, o padrão de resultados manteve-se.<sup>82</sup> Assim, o efeito antioxidante da NAC parece estar relacionado com a sua conversão em L – cisteína, resultando no aumento dos níveis de GSH.

Por outro lado, Hulten *et al* demonstraram que a NAC provocava uma diminuição da transcrição e secreção de TNF –  $\alpha$ , mostrando-se potencialmente útil na modulação da resposta inflamatória subsequente à lesão de I/R do pulmão. Contudo, o mecanismo molecular subjacente a este efeito não é, ainda, conhecido.<sup>84</sup>

Aguardam-se, portanto, que sejam realizados mais estudos que investiguem a utilização da NAC no tratamento e/ou prevenção da lesão pulmonar de I/R.

### III.VI.II – Alopurinol

As propriedades antioxidantes do alopurinol baseiam-se, essencialmente, no seu efeito inibidor da xantina oxidase, mas também na sua capacidade de sequestração dos radicais livres de oxigénio.<sup>27,78</sup> Contudo, a utilização deste fármaco como terapêutica antioxidante, na lesão de I/R do pulmão, não está suficientemente investigada.

Mesmo assim, existem referências que merecem alguma atenção. Kennedy *et al*, num modelo de I/R pulmonar em coelhos, verificaram que a pré – administração de alopurinol, em

doses reduzidas, proporcionou uma diminuição da produção de radical superóxido, no meio intracelular, e, por conseguinte, preveniu a lesão pulmonar de reperfusão.<sup>27</sup>

Mais tarde, Moore e a sua equipa observaram que a inibição da xantina oxidase, com alopurinol, revelou efeitos semelhantes aos observados com a imunoneutralização da P – selectina, ou seja, a prevenção do aumento da permeabilidade vascular e da acumulação de leucócitos polimorfonucleares no tecido pulmonar. Perante estes resultados, os investigadores postularam que a xantina oxidase teria uma função importante na mediação da infiltração leucocitária do tecido pulmonar.<sup>69</sup>

Visto que o alopurinol apresenta resultados promissores na modulação da lesão de I/R pulmonar, é importante que se realizem mais protocolos experimentais que aprofundem os benefícios que podem advir da sua utilização na prática clínica.

### III.VI.III – Superóxido dismutase e catalase

A *superóxido dismutase (SOD)* e a *catalase (CAT)* integram outro dos mecanismos endógenos de decomposição das ROS. De uma forma geral, a *SOD* catalisa a reacção de transformação dos aniões superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ )<sup>85, 86</sup> que, por sua vez, é decomposto em oxigénio ( $O_2$ ) e água ( $H_2O$ ), pela acção da *CAT*<sup>85</sup>.

Nas células dos mamíferos existem três formas diferentes de SOD: a SOD intracelular (iSOD), a SOD mitocondrial (mSOD) e a SOD extracelular (eSOD). Embora todas as formas sejam expressas no pulmão, a eSOD é a que mais se destaca. A expressão pulmonar de catalase também é elevada, essencialmente ao nível dos macrófagos alveolares.<sup>86</sup>

Kennedy *et al* observaram que o pré – tratamento com eSOD preveniu o desenvolvimento de lesão pulmonar por I/R. Contudo, a inibição da difusão do anião superóxido (do meio intracelular para o meio extracelular) resultou no bloqueio do efeito protector da eSOD. Estes resultados sugerem que a eSOD acciona o consumo do  $O_2^{\cdot-}$  extracelular, gerando um gradiente de concentração que promove a saída de  $O_2^{\cdot-}$  da célula. Portanto, quando esta difusão é bloqueada, o  $O_2^{\cdot-}$  mantém-se no interior da célula e a lesão oxidativa ocorre.<sup>27</sup> Num modelo semelhante, o grupo de Eppinger verificou que a administração de eSOD, antes da reperfusão, diminuiu significativamente a permeabilidade vascular pulmonar.<sup>24</sup>

Embora a expressão pulmonar e os efeitos antioxidantes da SOD e da CAT estejam bem definidos, mais uma vez, a aplicação terapêutica destas enzimas, na lesão de I/R pulmonar, carece de mais investigação.

### III.VI.IV – Quelantes do ferro

Dado o papel do íon ferro na produção de ROS, segundo a reacção de Fenton, é de esperar que a utilização de substâncias quelantes do íon ferro contribua para a melhoria dos danos oxidativos no tecido pulmonar sujeito a I/R.

A *desferroxamina*, um agente quelante do ferro, exhibe uma alta afinidade e especificidade para o íon ferro e previne que este intervenha nas reacções de oxidação – redução que culminam na formação de ROS. Estes efeitos foram comprovados por Zhao e os seus colaboradores, num modelo de I/R pulmonar em rato, em que a pré – administração de desferroxamina inibiu, significativamente, a oxidação de proteínas e a peroxidação lipídica.<sup>29</sup> Assim, esta molécula, já utilizada na terapêutica da sobrecarga férrica<sup>87</sup>, poderá ser uma hipótese a considerar na prevenção da lesão oxidativa causada por I/R pulmonar.

### III.VI.V – Via da Heme Oxigenase

A *heme oxigenase* catalisa a conversão do grupo heme em biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro “livre”. O ferro é então sequestrado pela ferritina, enquanto a biliverdina é metabolizada em bilirrubina. A heme oxigenase consiste de três isoformas, uma indutível, a heme oxigenase – 1, e duas constitutivas, a heme oxigenase – 2 e a heme oxigenase – 3.<sup>88</sup>

Diversos trabalhos experimentais têm dado conta do aumento da expressão da heme oxigenase – 1 na lesão de reperfusão, proporcionando efeitos citoprotectores contra o stress oxidativo<sup>88</sup>. O mecanismo segundo o qual a heme oxigenase – 1 confere protecção na lesão de I/R não está ainda clarificado, mas aparenta estar relacionado com os produtos gerados por esta enzima. O ferro “livre” estimula a formação de ferritina que, tal como a bilirrubina, possui propriedades antioxidantes. O monóxido de carbono apresenta propriedades protectoras da lesão pulmonar de I/R que passam pela supressão da via anti – fibrinolítica.<sup>19</sup>

É de salientar que o efeito da heme oxigenase – 1 e dos seus metabolitos situa-se num limiar entre citoprotecção e citotoxicidade. Por exemplo, o CO é conhecido pelos seus efeitos potencialmente tóxicos, nomeadamente, a deslocação do oxigénio da hemoglobina. Adicionalmente, a expressão aumentada de heme oxigenase – 1 pode resultar no aumento da produção e acumulação de ferro “livre” que, como já foi referido, catalisa a formação de radicais livres de oxigénio, originando um aumento do stress oxidativo e dos danos celulares que daí advêm.<sup>19</sup>

Por conseguinte, são necessários mais resultados experimentais que determinem os benefícios e consequências da intervenção farmacológica ao nível da via da heme oxigenase, na lesão de I/R do pulmão.

### III.VI.VI – Lazaróides

Os lazaróides são compostos 21 – aminoesteróides, inicialmente sintetizados como inibidores da peroxidação lipídica, subsequente à isquémia no sistema nervoso central. A peroxidação lipídica, subsequente à formação de ROS, estimula a produção de citocinas e a expressão de moléculas de adesão, resultando na activação, infiltração e adesão de leucócitos polimorfonucleares.<sup>20, 89</sup> Devido à sua estrutura lipofílica, os lazaróides incorporam-se na bicamada fosfolipídica das membranas celulares, bloqueando a propagação da peroxidação lipídica<sup>20, 89, 90</sup>.

Num modelo de transplante pulmonar em cães, Tanoue *et al* administraram o lazaróide U74500A, aos dadores (antes da extracção do pulmão) e aos receptores (antes da reperfusão), e observaram uma melhoria das trocas gasosas e o decréscimo dos níveis de peroxidação lipídica.<sup>90</sup>

Da mesma forma, o grupo de Takeyoshi administrou o lazaróide U74389G, 15 minutos antes da isquémia, e verificou a diminuição da lesão pulmonar e da infiltração de neutrófilos, assim como a inibição da expressão de IL – 1 $\beta$  no sangue.<sup>20</sup>

Noutro estudo, conduzido por Hillinger, o lazaróide U74006F promoveu uma diminuição da infiltração de neutrófilos no pulmão, o que pressupõe uma redução da lesão oxidativa. No entanto, não demonstrou qualquer efeito ao nível do edema pulmonar. Portanto, os investigadores consideraram que, no transplante pulmonar, o benefício da utilização dos lazaróides é reduzido, pelo que não deve ser considerada clinicamente.

### **III.VII – Inalação de monóxido de azoto**

Têm sido desenvolvidas algumas estratégias terapêuticas, no sentido de compensar a depleção dos níveis de NO, que ocorre durante a I/R pulmonar.

Uma das estratégias mais utilizadas é a administração de NO, por via inalatória. Todavia, os resultados obtidos são algo contraditórios. Meade *et al* concluíram que a administração inalatória de NO, 10 minutos depois da reperfusão, não tinha qualquer efeito significativo na lesão de I/R, em doentes sujeitos a transplante pulmonar<sup>91</sup>. De forma análoga, Botha *et al* verificaram que o NO inalado, durante os primeiros 30 minutos de reperfusão, não revelou qualquer efeito na prevenção da infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar, nem na concentração de IL – 8, concluindo que a terapêutica profiláctica com NO não confere benefício clinicamente relevante na lesão pulmonar de I/R.<sup>92</sup> Porém, Thabut *et al* apuraram que a administração conjunta de NO inalado e de pentoxifilina (derivado da metilxantina), antes e durante a reperfusão, previne a lesão pulmonar de reperfusão e diminui a *primary graft failure* que, frequentemente, sucede o transplante pulmonar.<sup>93</sup>

Portanto, estes resultados sugerem que, em monoterapia, o NO não revelou benefício terapêutico. Contudo, a administração do NO, num regime de politerapia, é uma hipótese que não deve ser negligenciada.

### **III.VIII – Inibição do Sistema do Complemento**

O conhecimento dos mecanismos pelos quais ocorre a activação do complemento na lesão de I/R permite desenvolver abordagens terapêuticas efectivas e específicas que limitam a resposta inflamatória e a lesão do tecido. Por isso, estudos que envolvem a inibição, depleção e/ou anticorpos anti – complemento são muito comuns e, no geral, culminam na redução da lesão de I/R.

#### **III.VIII.I – Inibição da Proteína C1**

Outra tentativa de inibição do complemento é através do C1 – INH que, além de regular a activação da cascata do complemento, ao nível da via clássica, também controla a

activação da cascata das cininas. A activação desta cascata resulta na clivagem do cininogénio, pela calicreína, formando bradicinina <sup>94</sup>. A bradicinina tem propriedades vasodilatadoras, causa contracção do músculo liso e aumenta a permeabilidade vascular <sup>94</sup>. Entre as propriedades protectoras do C1 – INH contam-se a preservação da função do endotélio vascular, a diminuição da acumulação e activação de leucócitos polimorfonucleares e, conseqüentemente, a redução da libertação de substâncias tóxicas e da lesão do tecido, mediada pelos neutrófilos <sup>94,95</sup>.

Neste âmbito, Salvatierra *et al* desenharam um estudo para avaliar o potencial benefício do C1 – INH na prevenção da lesão de I/R após transplante pulmonar, em cães. Os resultados obtidos confirmaram que, de facto, a administração de C1 – INH prevenia a hipoxémia e reduzia a hipertensão vascular pulmonar. Verificaram também que o C1 – INH prevenia a activação do complemento, a expressão aumentada de moléculas de adesão leucocitária, o aumento da resistência vascular periférica e a activação da cascata das cininas. Desta forma, a inibição conjunta das duas cascatas (complemento e cininas) parece ser a chave do papel preventivo deste inibidor na activação leucocitária. <sup>95</sup>

Estes resultados foram confirmados, mais recentemente, pela equipa de Scherer, que investigou a contribuição do C1 – INH na redução da lesão pulmonar de reperfusão num modelo experimental de autotransplante do pulmão esquerdo, em ovelhas. <sup>94</sup>

Não restam, portanto, dúvidas de que o C1 – INH reduz a lesão de I/R subjacente ao transplante pulmonar. Por isso, a administração de C1 – INH, em combinação com inibidores de outros mecanismos de inflamação, poderá ter um papel muito importante na prevenção e/ou tratamento da lesão de reperfusão pulmonar.

### **III.VIII.II – Receptor Tipo 1 do Complemento**

O mediador membranar, *CR1*, apenas se encontra expresso nos eritrócitos e leucócitos. Estudos *in vivo* revelaram que este receptor é um potente inibidor da lesão vascular pulmonar dependente do complemento e que reduz a permeabilidade vascular e a acumulação de neutrófilos.

Em modelos de I/R do miocárdio, o CR1 demonstrou ser efectivo na supressão da activação do complemento, em baixas doses, e reduziu a lesão inflamatória do tecido.

Especificamente no pulmão, Schmid *et al* observaram, após alotransplante pulmonar

em porcos, que o CR1 reduzia a migração de neutrófilos e a supressão da formação de MAC's no tecido do pulmão transplantado inibindo, portanto, as duas vias do complemento.<sup>58</sup>

Visto que o CR1 reduz a lesão pulmonar de reperfusão e bloqueia a activação local do complemento, a administração de moléculas agonistas, a par de outras abordagens farmacológicas, pode ser um recurso importante na prevenção da lesão pulmonar de I/R.

### III.VIII.III – Inibição do Receptor C3a

Embora a C5a seja mais potente, nas suas acções, que a C3a, a concentração plasmática desta última é aproximadamente 10 vezes superior<sup>58, 63</sup>. Daí que a investigação em torno da inibição do receptor *C3aR* seja tão importante.

Em 2001, Ames *et al* desenvolveram um antagonista não peptídico com grande afinidade para o *C3aR* humano, denominado SB290157. Este composto antagoniza a cascata de sinalização dependente do cálcio e a contracção do músculo liso, induzidas pela *C3a*. Além disto, o SB290157 também mostrou inibir a mobilização e acumulação de neutrófilos, num modelo de neutrofilia nas vias aéreas que, provavelmente, se assemelha ao observado na lesão de I/R pulmonar.<sup>63</sup>

Posteriormente, Proctor *et al* confirmaram a elevada afinidade, selectividade e actividade anti-inflamatória do SB290157 e desenvolveram outro antagonista do *C3aR*. No entanto, no modelo que estudaram, lesão de I/R intestinal em ratos, chegaram à conclusão que o antagonismo do *C3aR* não deveria ser o mecanismo responsável pela actividade anti-inflamatória desta molécula, sugerindo que outros receptores, ainda não identificados, possam estar envolvidos no mecanismo de protecção do antagonista.<sup>60</sup>

Atendendo a estes resultados, de certa forma, ambíguos, permanece a necessidade de implementação de mais estudos, no sentido do desenvolvimento de outros antagonistas do *C3aR*, uma vez que este receptor aparenta ter potencial para se tornar num dos alvos terapêuticos no tratamento e/ou prevenção da lesão pulmonar provocada por I/R.

## III.IX – Inibição das Citocinas

### III.IX.I – Inibição do Factor de Necrose Tumoral – $\alpha$

Dado que o TNF –  $\alpha$  tem um papel importante na regulação de quimiotaxia dos neutrófilos e na regulação da expressão de moléculas de adesão e citocinas pró - inflamatórias, a sua do TNF –  $\alpha$  pode ser uma abordagem terapêutica a ter em conta na lesão pulmonar originada por I/R.

Caty *et al* constataram que a utilização de anticorpos anti – TNF –  $\alpha$ , apesar de ter atenuado a lesão endotelial, não contribuiu para a diminuição da acumulação de neutrófilos no tecido pulmonar.<sup>38</sup> No entanto, alguns anos mais tarde, Krishnadasan e os seus colegas atestaram que a administração de anticorpo anti – TNF –  $\alpha$  provocou uma diminuição estatisticamente significativa na acumulação de neutrófilos no pulmão, assim como na quantidade de neutrófilos presentes nos alvéolos pulmonares<sup>37</sup>. Estes resultados, aparentemente algo contraditórios, realçam a necessidade de desenvolvimento de mais investigação no sentido de averiguar o efeito da inibição do TNF –  $\alpha$  na migração dos neutrófilos para o tecido pulmonar.

No que respeita à permeabilidade vascular, vários estudos apontam no mesmo sentido, ou seja, a administração de anticorpos anti – TNF –  $\alpha$  provoca uma diminuição acentuada da permeabilidade vascular.<sup>37, 40</sup> É de salientar, porém, que este efeito não é dependente da dose de TNF –  $\alpha$  administrada, pois o aumento da mesma não se traduziu numa amplificação da redução da lesão vascular.<sup>37</sup>

O bloqueio do TNF –  $\alpha$ , no estudo conduzido por Krishnadasan, originou ainda uma diminuição acentuada na expressão da maioria dos mRNA das citocinas estudadas (IL – 2, IL – 4, IL – 10, IFN –  $\gamma$  e IL – 1 $\beta$ ).<sup>37</sup>

Embora os efeitos dos anticorpos anti – TNF –  $\alpha$ , ainda não estejam completamente estabelecidos, a sua utilização parece ter efeitos benéficos, quer ao nível da modulação da migração dos neutrófilos para o tecido pulmonar, quer na expressão outras citocinas pró – inflamatórias. Por isso, à semelhança de outras patologias, a inibição do TNF –  $\alpha$  poderá, no futuro, tornar-se uma estratégia terapêutica importante na lesão de I/R do pulmão.

### **III.IX.II – Inibição das Interleucinas**

Uma vez encontradas semelhanças ao nível das funções e padrões de expressão do TNF –  $\alpha$  e da IL –  $1\beta$ , é expectável que a inibição desta última produza efeitos análogos à inibição do TNF –  $\alpha$ , o que, de facto se confirma.

Assim, a administração de anticorpos anti – IL –  $1\beta$  resultou na diminuição do número de neutrófilos no tecido e nos alvéolos pulmonares.<sup>37</sup> Também a permeabilidade vascular foi reduzida pela imunoneutralização da IL –  $1\beta$ , revelando-se dependente da dose de anticorpo utilizada.<sup>37</sup>

Como esperado, o bloqueio da IL –  $1\beta$ , também originou uma redução da expressão da IL – 2, IL – 4, IL – 10, IFN –  $\gamma$  e IL –  $1\beta$ , embora o efeito, em cada uma delas, tenha sido diferente do observado com o TNF –  $\alpha$ .<sup>37</sup>

Todavia, é de salientar que, apesar da IL –  $1\beta$  e do TNF –  $\alpha$  apresentarem funções fisiológicas similares, a inibição conjunta destes dois mediadores apresenta vantagens, relativamente ao bloqueio de cada um deles, individualmente.<sup>37</sup>

Da mesma forma, a utilização de anticorpos monoclonais anti – IL – 8, no início da reperfusão, também reduziu, significativamente, a infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar e a destruição da arquitectura alveolar.<sup>36, 44</sup> Estes resultados sugerem que a inibição desta citocina, em conjunto com outras abordagens terapêuticas, pode ser útil na prevenção e/ou tratamento da lesão pulmonar de reperfusão.

### **III.X – Inibição da Adesão Leucocitária**

A sequência de eventos descrita na secção II.VII sugere a existência de muitos pontos, no mecanismo de adesão leucócito – célula endotelial, que podem ser vistos como potenciais alvos terapêuticos.

#### **III.X.I – Inibição das Selectinas**

O facto da ligação das selectinas aos leucócitos anteceder a ligação das integrinas  $\beta_2$  ao ICAM – 1, faz destas moléculas alvos terapêuticos atractivos no sentido de bloquear,

precocemente, a cascata inflamatória. Além disto, o bloqueio das selectinas é menos passível de causar susceptibilidade a infecções bacterianas, que o bloqueio das integrinas  $\beta_2$ <sup>71</sup>, o que se reveste de uma especial importância quando se trata de lesão de I/R pulmonar, visto que a principal situação clínica associada é o transplante pulmonar.

Foram realizados diversos estudos de forma a investigar o possível benefício da utilização de agentes anti – selectinas.

Alguns modelos têm recorrido a anticorpos anti – P – selectina, que têm mostrado eficácia na protecção da lesão de I/R.<sup>70</sup> Em 1997, Naka *et al*, num modelo de transplante pulmonar em ratos, verificaram que a administração de um anticorpo anti – P – selectina, 10 minutos antes de reperfusão, assim como a inactivação do gene que a codifica, diminuiu a infiltração de leucócitos, melhorou a função do pulmão transplantado e a sobrevivência dos doentes.<sup>96</sup>

No que respeita à L – selectina, existem resultados, de certa forma, contraditórios. Moore *et al*, afirmaram que a imunoneutralização da L – selectina não tinha efeito na prevenção do aumento da permeabilidade vascular e da retenção de neutrófilos, induzidas pela I/R<sup>69</sup>. Por outro lado, Seekamp e os seus colegas, num modelo de lesão pulmonar após I/R infrarenal em ovelhas, concluíram que a acumulação de neutrófilos e, portanto, a lesão pulmonar, foram significativamente reduzidas pela administração do anticorpo anti – L – selectina, EL – 246, embora reconheçam que o bloqueio da L – selectina não confere 100% de redução na acumulação de leucócitos<sup>97</sup>. Demertzis *et al*, recorrendo a um modelo de autotransplante pulmonar em ovelhas, descreveram o EL – 246 como sendo inibidor, não só da L – selectina, mas também da E – selectina, e presenciaram a redução do edema alveolar, da activação de neutrófilos e da permeabilidade vascular. Confirmando, portanto, os resultados obtidos pelo grupo de Seekamp.<sup>98</sup>

A descoberta de que a adesão mediada pelas selectinas é dependente da sua ligação a carboidratos de outras células, nomeadamente, oligossacáridos derivados do ácido siálico – *sialyl Lewis<sup>a</sup>* e *sialyl Lewis<sup>x</sup>*, criou mais uma hipótese de intervenção terapêutica: a inibição da ligação das selectinas a estas moléculas. Assim, a estratégia mais comum passa pela produção de análogos bioactivos e bioestáveis desses ligandos.<sup>99</sup>

Estudos que usaram tri – e tetrassacáridos do *sialyl Lewis<sup>x</sup>* demonstraram que estas moléculas atenuaram a acumulação neutrofílica e a lesão pulmonar, em ratos sujeitos a

inflamação aguda pulmonar mediada pela *P* – ou pela *E* – *selectina*. Mais tarde, Reignier *et al* apostaram numa outra substância, o 3' – *sulfated Lewis<sup>a</sup>* (SuLa) que, *in vitro*, se apresentava como um ligando mais potente para a L – e E – *selectinas*, do que os análogos utilizados até então. Os resultados que obtiveram indicaram que o SuLa reduzia a lesão pulmonar causada por I/R e a sequestração de neutrófilos no pulmão, através da inibição da adesão dos leucócitos polimorfonucleares às células endoteliais.<sup>99</sup>

Portanto, os resultados obtidos a partir dos estudos acima referidos e de outros, não mencionados, sugerem que os agentes supracitados, podem ser uma estratégia efectiva de bloqueio da adesão leucócito – endotélio, limitando a acumulação de leucócitos que ocorre na lesão de I/R.

### III.X.II – Inibição das Integrinas

Ao longo dos anos, diversos dados experimentais sugerem que a intervenção farmacológica na adesão leucocitária mediada pelas integrinas  $\beta_2$  pode limitar o desenvolvimento da lesão pós isquémia – reperfusão.

Ma *et al*, em 1991, estudaram os efeitos de um anticorpo monoclonal anti – CD18 e concluíram que a sua administração, antes da reperfusão, reduzia a adesão dos neutrófilos à parede endotelial e retardava a sua acumulação no tecido isquémico do miocárdio, exercendo, portanto, um efeito protector do endotélio e da lesão do miocárdio, induzidas pela I/R. Além disto, constataram que, comparativamente a outros resultados obtidos com anticorpos direccionados para as cadeias  $\alpha$ , a supressão da acumulação dos neutrófilos foi bastante superior, assim como o efeito cardioprotector.<sup>100</sup>

Poucos anos mais tarde e num modelo de I/R após transplante pulmonar em cães, Kapelanski *et al* administraram outro anticorpo anti – CD18, imediatamente antes do início da reperfusão, e observaram que a inibição das integrinas –  $\beta_2$  alterava a evolução da lesão de I/R pulmonar, nomeadamente, ao nível das trocas gasosas no pulmão transplantado.<sup>101</sup>

Desta forma, o desenvolvimento de anticorpos anti – CD18 parece ser uma estratégia a explorar, no sentido de encontrar mais um mecanismo de bloqueio da adesão leucócito – endotélio e, conseqüentemente, de atenuação e/ou prevenção da lesão de I/R do pulmão.

### **III.X.III – Inibição das Imunoglobulinas**

Entre as moléculas de adesão, a família das imunoglobulinas é a que tem gozado de menor atenção por parte dos investigadores. Contudo, alguns estudos realizados reportam que a utilização de anticorpos monoclonais específicos para a ICAM – 1 reduz a adesão e migração leucocitária e a permeabilidade vascular, induzidas pela I/R, assim como o número de agregados leucócitos – plaquetas em, aproximadamente 50%.<sup>69, 102</sup>

Portanto, analogamente às outras moléculas de adesão, as imunoglobulinas, sobretudo a ICAM – 1, parecem também poder ser alvo de modulação farmacológica, resultando, igualmente, na atenuação da adesão leucocitária.

### **III.X.IV – Inibição do Factor Nuclear – $\kappa$ B**

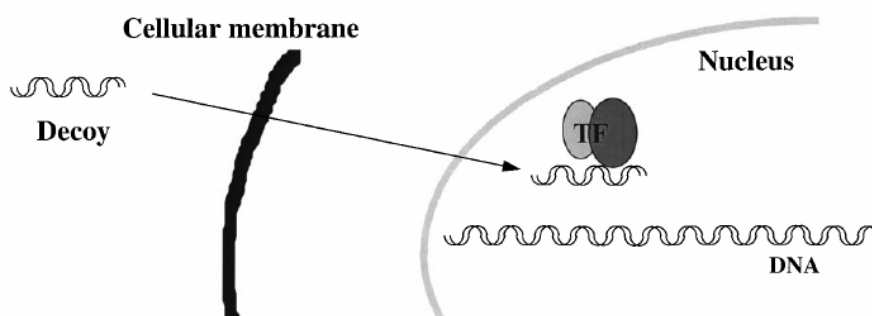
Sendo o NF- $\kappa$ B, um factor regulador da transcrição de diversos mediadores pró – inflamatórios e das moléculas de adesão, faz sentido que a sua inibição possa ser uma forma potencialmente eficaz de bloquear e/ou atenuar alguns dos processos inerentes à resposta inflamatória. Por isso, o NF- $\kappa$ B tem sido alvo de diversos estudos, dos quais resultaram diferentes estratégias para a sua inibição.

Uma dessas abordagens é o bloqueio da via de degradação proteolítica da proteína I –  $\kappa$ B $\alpha$ . A inibição da fosforilação e degradação da I –  $\kappa$ B $\alpha$  provoca a retenção do NF- $\kappa$ B, no citoplasma, pelo que este não se liga aos elementos promotores do DNA. Desta forma, a transcrição de algumas citocinas pró – inflamatórias e de moléculas de adesão é suprimida.<sup>70</sup> Este mecanismo de acção é partilhado por alguns anti – inflamatórios, entre eles, os sais de ouro, a aspirina e o salicilato de sódio<sup>70</sup> e por duas citocinas anti – inflamatórias, a *interleucina 10* (IL – 10) e a *interleucina 13* (IL – 13), que actuam ao nível dos macrófagos alveolares e do tecido pulmonar<sup>103</sup>. Dada a sua expressão pulmonar, as IL – 10 e 13 poderão ser uma alternativa no controlo da produção de citocinas pró – inflamatórias e de moléculas de adesão, tão características da lesão pulmonar de I/R, podendo contribuir para a sua prevenção e/ou tratamento.

Outro mecanismo de inibição do NF- $\kappa$ B é o desenvolvimento de *antisense oligodeoxynucleotids* (As – ODN's) e *transcription factor decoys* (TFD's), cuja utilização, em modelos experimentais de I/R, tem sido bem sucedida na inibição da expressão de citocinas e de moléculas de adesão.

Os As – ODN's são sequências de cadeias simples de DNA que se ligam, de forma complementar, a um mRNA específico, bloqueando a tradução da proteína correspondente. No caso concreto do NF- $\kappa$ B, têm sido produzidos As – ODN's que impedem a tradução das subunidades p50 e p65<sup>70</sup>. Assim, a expressão de moléculas de adesão, mediada pelo NF- $\kappa$ B, é inibida. De facto, Sokoloski et al descreveram que As – ODN's desenvolvidos para o mRNA da subunidade p65 provocaram uma diminuição da *upregulation* da integrina CD11b/CD18<sup>104</sup>.

Os TFD's são cadeias duplas de As – ODN's que se ligam aos factores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B, interferindo com a regulação do gene (Figura 12). Ao contrário dos As – ODN's, neste caso a produção do NF- $\kappa$ B não é afectada, apenas a sua capacidade de se ligar ao elemento regulador do DNA. Os TFD's têm sido utilizados em variados estudos que reportam a inibição da expressão de ICAM – 1, VCAM – 2 e E – selectina, bem como de citocinas pró – inflamatórias, o que comprova a sua acção protectora no processo de adesão celular.<sup>70</sup>



**Figura 12** – Mecanismo de acção dos *transcription factor decoys* (TFD's). (Adaptado de Panés et al)<sup>70</sup>

## **IV – Conclusão**

A lesão pulmonar de isquemia e reperfusão assume cada vez mais importância no universo clínico, a par com o crescimento do número de transplantes pulmonares. Ao longo dos anos, tem sido efectuada muita investigação em torno dos mecanismos fisiopatológicos da lesão de isquemia – reperfusão. Contudo, este tipo de lesão não se encontra ainda completamente caracterizada no pulmão, pois a grande maioria dos estudos centralizam-se na isquemia – reperfusão cardíaca. Embora alguns dos mecanismos inflamatórios possam ser comuns, entre o pulmão e o coração, outros serão, certamente, exclusivos do tecido pulmonar. Mesmo assim, ao longo dos últimos anos, foram desenvolvidos alguns estudos que permitiram aprofundar o conhecimento dos processos fisiopatológicos da lesão pulmonar de I/R. De acordo com esses trabalhos, o período de isquemia – reperfusão pulmonar caracteriza-se, essencialmente, pela formação de radicais livres de oxigénio e por uma intensa resposta inflamatória, nomeadamente, libertação de mediadores pró – inflamatórios e adesão leucocitária à parede endotelial.

Este aprofundar de conhecimentos possibilitou, assim, a consideração de novas estratégias farmacológicas para a prevenção e / ou tratamento desta patologia. No entanto, grande parte destas abordagens encontra ainda sob investigação, razão pela qual poucas são aplicadas na prática clínica.

Conclui-se, portanto, que ainda existe muito trabalho de investigação a desenvolver, futuramente, para que se optimizem as abordagens farmacológicas já equacionadas e / ou sejam exploradas estratégias farmacológicas inovadoras.

---

## V – Bibliografia

1. Pinheiro BV, Holanda MA, Araújo FG, Romaldini H. Lesão pulmonar de reperfusão. *J Pneumol.* 1999; 25 (2): 124 – 136.
2. Silva OC, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré – condicionamento isquêmico. *Acta cir. bras.* 2002; 17 (supl 3): 96 – 100.
3. Riedemann NC, Ward PA. Complement in ischemia reperfusion injury. *AJP.* 2003; 162 (2): 363 – 367.
4. Evora PR, Pearson PJ, Seccombe JF, Schaff HV. Lesão de isquemia-reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. *Arq Bras Cardiol.* 1996; 66 (4): 239 – 245.
5. Chaumoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci.* 2000; 5: 103 – 109.
6. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001; 94 (6): 1133 – 1138.
7. Huang Y, Shan J, Wang C, Ma J, Li Dan, Li L *et al.* Can ischemic preconditioning alone really protect organs from ischemia reperfusion injury in transplantation? *Transplant Immunology.* 2009; 20: 127 – 131.
8. Fisher AB, Dodia C, Tan Z, Ayene I, Eckenhoff RG. Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia. *J Clin Invest.* 1991; 88: 674 – 679.
9. Koike K, Yamamoto Y, Hori Y, Ono T. Group IIA phospholipase A<sub>2</sub> mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Annals of Surgery.* 2000; 232 (1): 90 – 97.
10. Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y *et al.* Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2000; 105 (10): 1363 – 1371.
11. Fisher AB. Reactive oxygen species and cell signalling with lung ischemia. *UHM.* 2004; 31 (1): 97 – 103.
12. Zhao G, Al-Mehdi AB, Fisher AB. Anoxia – reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am J Physiol.* 1997; L1112 – L1117.
13. Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia – reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando).* 2009; 23 (1): 1 – 10.
14. Boros P, Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant.* 2006; 6: 652 – 658.

- 
15. Botha P, Jeyakanthan M, Rao JN, Fisher AJ, Prabhu M, Dark JH *et al.* Inhaled nitric oxide for modulation of ischemia – reperfusion injury in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2007; 26 (11): 1199 – 1205.
  16. Sakuma T, Takahashi K, Ohya N, Kajikawa O, Martin TR, Albertine KH *et al.* Ischemia-reperfusion lung injury in rabbits: mechanisms of injury and protection. *Am J Physiol.* 1999; 276 (Lung Cell. Mol. Physiol. 20): L137 – L145.
  17. Shoji T, Omasa M, Nakamura T, Yoshimura T, Yoshida H, Ikeyama K *et al.* Mild hypothermia ameliorates lung ischemia reperfusion injury in an ex vivo rat lung model. *Eur Surg Res.* 2005; 37: 348 – 353.
  18. King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD *et al.* Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2000; 69: 1681 – 1685.
  19. Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia – reperfusion – induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 490 – 511.
  20. Takeyoshi I, Iwanami K, Kamoshita N, Takahashi T, Kobayashi J, Tomizawa N *et al.* Effect of lazaroid U-74389G on pulmonary ischemia – reperfusion injury in dogs. *Journal of Investigative Surgery.* 2001; 14: 83 – 92.
  21. Meade MO, Granton JT, Matte – Martyn A, McRae K, Weaver B, Cripps P *et al.* A randomized trial of inhaled nitric oxide to prevent ischemia – reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 1483 – 1489.
  22. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO *et al.* The registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty – sixth official adult lung transplantation and heart – lung transplantation report – 2009. *J Heart Lung Transplant.* 2009; 28: 1031 - 1049.
  23. Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR *et al.* Primary graft failure following lung transplantation. *Chest.* 1998; 114: 51 – 60.
  24. Eppinger MJ, Deeb GM, Bollinh SF, Ward PA. Mediators of ischemia – reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol.* 1997; 150 (5): 1773 – 1784.
  25. Fiser SM, Curtis GT, Long SM, Kaza AK, Kern JA, Jones DR *et al.* Ischemia – reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73: 1041 – 1048.
  26. Jordan S, Mitchell JÁ, Quinlan GJ, Goldstraw P, Evans TW. The pathogenesis of lung injury following pulmonary resection. *Eur Respir J.* 2000; 15: 790 – 799.
-

- 
27. Kennedy TP, Rao NV, Hopkins C, Pennington L, Tolley E, Hoidal JR. Role of reactive oxygen species in reperfusion injury of the rabbit lung. *J Clin Invest.* 1989; 83: 1326 – 1335.
  28. Dorweiler B, Pruefer D, Andradi TB, Maksan SM, Schmiedt W, Neufang A *et al.* Ischemia – reperfusion injury. Pathophysiology and clinical implications. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2007; 33: 600 – 612.
  29. Zhao G, Ayene IS, Fisher AB. Role of iron in ischemia – reperfusion oxidative injury or rat lungs. *Am J Respir.* 1997; 16: 293 – 299.
  30. Liu M, Tremblay L, Cassivi SD, Bai XH, Mourgeon E, Pierce AF *et al.* Alterations of nitric oxide synthase expression and activity during rat lung transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 278: L1071 – L1081.
  31. Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, Ma XL. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J.* 1991; 5: 2029 – 2034.
  32. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico. Revisão. *Acta cir. bras.* 2002; 17 (6): 417 – 423.
  33. Le Cras TD, McMurtry IF. Nitric oxide production in the hypoxic lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 280: L575 – L582.
  34. Vural KM, Liao H, Oz MC, Pinsky DJ. Effects of mast cell membrane stabilizing agents in a rat lung ischemia – reperfusion model. *Ann Thorac Surg.* 2000; 69: 228 – 232.
  35. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1997; d12 – 26.
  36. Perrot M, Sekine Y, Fischer S, Waddell TK, McRae K, Liu M *et al.* Interleukin – 8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 211 – 215.
  37. Krishnsadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia – reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 125: 261 – 272.
  38. Caty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SI. Evidence for tumor necrosis factor induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia – reperfusion injury. *Ann Surg.* 1990; 212 (6): 694 – 700.

- 
39. Serrick C, Adoumie R, Giaid A, Shennib H. The early release of interleukin – 2, tumor necrosis factor –  $\alpha$  and interferon –  $\gamma$  after ischemia reperfusion injury in the lung allograft. *Transplantation*. 1994; 58 (11): 1158 – 1162.
  40. Khimenko PL, Bagby GJ, Fuseler J, Taylor AE. Tumor necrosis factor –  $\alpha$  in ischemia and reperfusion injury in rat lungs. *J Appl Physiol*. 1998; 85 (6): 2005 – 2011.
  41. Hocking DC, Phillips PG, Ferro TJ, Johnson A. Mechanisms of pulmonary edema induced by tumor necrosis factor –  $\alpha$ . *Circ Res*. 1990; 67: 68 – 77.
  42. <http://www.asma-bronquica.com.br/medical/TNF.html>, acessado em 7 Setembro 2010
  43. Chang D – M, Hsu K, Ding Y – A, Chiang C – H. Interleukin – 1 in ischemia – reperfusion acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156: 1230 – 1234.
  44. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol*. 1994; 56: 559 – 564.
  45. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J*. 1994; 8: 504 – 512.
  46. Shennib H, Lee AGL, Kuang JQ, Yanagisawa M, Ohlstein EH, Giaid A. Efficacy of administering an endothelin – receptor antagonist (SB209670) in ameliorating ischemia – reperfusion injury in lung allografts. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157: 1975 – 1981.
  47. Miotla JM, Jeffery PK, Hellewell PG. Platelet – activating factor plays a pivotal role in the induction of experimental lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998; 18: 197 – 204.
  48. Nagase T, Ishii S, Kume K, Uozumi N, Izumi T, Ouchi Y *et al*. Platelet – activating factor mediates acid – induced lung injury in genetically engineered mice. *J Clin Invest*. 1999; 104: 1071 – 1076.
  49. Chao W, Olson MS. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J*. 1993; 292: 617 – 629.
  50. Lehr HA, Gohlmann A, Nolte D, Keppler D, Messmer K. Leukotrienes as mediators in ischemia – reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J Clin Invest*. 1991; 87: 2036 – 2041.
  51. Klausner JM, Paterson IS, Goldman G, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D *et al*. Thromboxane A<sub>2</sub> mediates increased pulmonary microvascular permeability following limb ischemia. *Circ Res*. 1989; 64: 1178 – 1189.
-

- 
52. Smyth EM, Fitzgerald GA. Os eicosanóides: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e compostos relacionados. In: Katzung BG. Farmacologia Básica e Clínica. 10ª Ed. São Paulo: McGraw – Hill; 2007. 261 – 274.
  53. Seeley RR, Stephens TD, Tate P. Sistema Linfático e Imunidade. In: Anatomia & Fisiologia. 6ª Edição. McGraw-Hill; 2005. 783 – 824.
  54. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL. Complement activation following oxidative stress. *Molecular Immunology*. 1999; 36: 941 – 948.
  55. [http://www.nature.com/ki/journal/v59/n4/fig\\_tab/4492147f1.html](http://www.nature.com/ki/journal/v59/n4/fig_tab/4492147f1.html), acessado em 21 Setembro 2010
  56. Yamamoto GR, Portinho CP. Sistema Complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. *Rev Ass Med Brasil*. 2001; 47 (1): 41 – 51.
  57. Riedemann NC, Ward PA. Complement in Ischemia Reperfusion Injury. *AJP*. 2003; 162 (2): 363 – 367.
  58. Schmid RA, Zollinger A, Singer T, Hillinger S, Leon – Wyss JR, Schöb OM *et al*. Effect of soluble complement receptor type 1 on reperfusion edema and neutrophil migration after lung allotransplantation in swine. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998; 116: 90 – 97.
  59. Ivey CL, Williams FM, Collins PD, Jose PJ, Williams TJ. Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit. *J Clin Invest*. 1995; 95: 2720 – 2728.
  60. Proctor LM, Arumugan TV, Shiels I, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Comparative anti-inflammatory activities of antagonists to C3a and C5a receptors in a rat model of intestinal ischaemia/reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*. 2004; 142: 756 – 764.
  61. Mulligan MS, Schmid E, Beck – Schimmer B, Till GO, Friedl HP, Brauer RB *et al*. Requirement and role of C5a in acute lung inflammatory injury in rats. *J Clin Invest*. 1996; 98: 503 – 512.
  62. Ames RS, Lee D, Foley JJ, Jurewicz AJ, Tornetta MA, Bautsch W *et al*. Identification of a selective nonpeptide antagonist of the anaphylatoxin C3a receptor that demonstrates anti-inflammatory activity in animal models. *J Immunol*. 2001; 166: 6341 – 6348.
-

- 
63. Hoffmann T, Böttger EC, Baum HP, Messner M, Hadding U, Bitter – Suermann D. *In vivo* effects of C3a on neutrophils and its contribution to inflammatory lung processes in a guinea – pig model. *Clin Exp Immunol.* 1988; 71: 486 – 492.
  64. Stahl GL, Xu Y, Hao L, Miller M, Buras JA, Fung M *et al.* Role of the alternative pathway in ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2003; 162: 449 – 455.
  65. Williams JP, Pechet TTV, Weiser MR, Reid R, Kobzik L, Moore Jr F *et al.* Intestinal reperfusion injury is mediated by IgM and complement. *J Appl Physiol.* 1999; 86 (3): 938 – 942.
  66. Schraufstatter IU, Trieu K, Sikora L, Sriramarao P, DiScipio R. Complement C3a and C5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. *J Immunol.* 2002; 169: 2102 – 2110.
  67. Kilgore S, Schmid E, Shanley TP, Flory CM, Maheswari V, Tramontini NL *et al.* Sublytic concentrations of the membrane attack complex of complement induce endothelial interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Am J Pathol.* 1997; 150: 2019 – 2031.
  68. Stahl GL, Reenstra WR, Frenzl G. Complement – mediated loss of endothelium – dependent relaxation of porcine coronary arteries. *Circ Res.* 1995; 76: 575 – 583.
  69. Moore TM, Khimenko P, Adkins WK, Miyasaka M, Taylor AE. Adhesion molecules contribute to ischemia and reperfusion induced injury in the isolated rat lung. *J. Appl. Physiol.* 1995; 78 (6): 2245 – 2252.
  70. Panés J, Perry M, Granger DN. Leukocyte – endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *British Journal of Pharmacology.* 1999; 126: 537 – 550.
  71. Chamoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci.* 2000; e103 – 109.
  72. Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN. Heterogeneity of expression of E – and P – selectins *in vivo*. *Circ Res.* 1996; 79: 560 – 569.
  73. Welbourn R, Goldman G, Kobzik L, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D *et al.* Role of neutrophil adherence receptors (CD18) in lung permeability following lower torso ischemia. *Circ Res.* 1992; 71: 82 – 86.
  74. [http://imgt.cines.fr/textes/IMGTEducation/Tutorials/Cancer/\\_FR/Oncogene/IKB.html](http://imgt.cines.fr/textes/IMGTEducation/Tutorials/Cancer/_FR/Oncogene/IKB.html),  
acedido em 28 Setembro 2010
-

- 
75. Ochs M, Nenadic I, Fehrenbach A, Albes JM, Wahlers T, Richter J et al. Ultrastructural alterations in intraalveolar surfactant subtypes after experimental ischemia and reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 718 – 724.
76. Casals C, Varela A, Ruano MLF, Valiño F, Pérez – Gil J, Torre N et al. Increase of C – reactive protein and decrease of surfactant protein A in surfactant after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 43 – 49.
77. Kermeen FD, McNeil KD, Fraser JF, McCarthy J, Ziegenfuss MD, Mullany D et al. Resolution of severe ischemia – reperfusion injury post – lung transplantation after administration of endobronchial surfactant. *J Heart Lung Transplant.* 2007; 26: 850 – 856.
78. Silva FM, Silveira RJ, Hallal AL, Filho CW, Cardoso JJ, Leão LE. Efeito da ventilação com diferentes fracções inspiradas de oxigénio e do alopurinol na isquemia – reperfusão pulmonar em ratos. *Rev. Col. Brás. Cir.* 2004; 31 (5): 291 – 298.
79. Li G, Chen S, Lou W, Lu E. Protective effects of ischemic preconditioning on donor lung in canine lung transplantation. *Chest.* 1998; 11: 1356 – 1359.
80. Soncul H, Öz E, Kalaycioglu S. Role of ischemic preconditioning on ischemia – reperfusion injury of the lung. *Chest.* 1999; 115: 1672 – 1677.
81. Bulger EM, Maier RV. Antioxidants in critical illness. *Arch Surg.* 2001; 136: 1201 – 1207.
82. Inci I, Zhai W, Arni S, Hillinger S, Vogt P, Weder W. N – acetylcysteine attenuates lung ischemia – reperfusion injury after lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2007; 84: 240 – 246.
83. <http://www.benbest.com/nutrceut/AntiOxidants.html>, acedido em 15 Setembro 2010
84. Hulten LM, Lindmark H, Schersten H, Wiklund O, Nilson FN, Riise GC. Butylated hydroxytoluene and N – acetylcysteine attenuates tumor necrosis factor – alpha (TNF – alpha) secretion and TNF – alpha mRNA expression in alveolar macrophages from human lung transplant recipients in vitro. *Transplantation.* 1998; 66: 364 – 369.
85. Zimmerman JJ. Therapeutic application of oxygen radical scavengers. *Chest.* 1991; 100: 189S – 192S.
86. Vuokko L, Crapo K, Crapo J. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 1600 – 1619.
87. <http://www.infarmed.pt/formulario/ficha.php?idc=286>, acedido em 12 Setembro 2010
-

- 
88. Otterbein LE, Choi AM. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279: L1029 – L1037.
  89. Hillinger S, Schmid RA, Stammberger U, Boehler A, Schöb OM, Zollinger A *et al.* Donor and recipient treatment with the Lazaroid U – 74006F do not improve post – transplant lung function in swine. *Eur J of Cardiothorac Surg.* 1999; 15: 475 – 480.
  90. Tanoue Y, Morita S, Ochiai Y, Zhang Q – W, Hisahara M, Miyamoto K. Successful twenty – four – hour canine lung preservation with lazaroid U74500A. *J Heart Lung Transplant.* 1996; 15 (1): 43 – 50.
  91. Meade MO, Granton JT, Matte – Martyn A, McRae K, Weaver B, Cripps P *et al.* A Randomized trial of inhaled nitric oxide to prevent ischemia – reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 1483 – 1489.
  92. Botha P, Jeyakanthan M, Rao JN, Fisher AJ, Prabhu M, Dark JH *et al.* Inhaled nitric oxide for modulation of ischemia – reperfusion injury in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2007; 26: 1199 – 1205.
  93. Thabut G, Brugière O, Lesèche G, Stern JB, Fradj K, Hervé P *et al.* Preventive effect of inhaled nitric oxide and pentoxifylline in ischemia/reperfusion injury after lung transplantation. *Clin Transplant.* 2001; 71 (9): 1295 – 1300.
  94. Scherer M, Demertzis S, Langer F, Moritz A, Schäfers HJ. C1 – esterase inhibitor reduces reperfusion injury after lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73: 233 – 239.
  95. Salvatierra A, Velasco F, Rodriguez M, Alvarez A, Lopez – Pedrera R, Ramirez R *et al.* C1 – esterase inhibitor prevents early pulmonary dysfunction after lung transplantation in the dog. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155: 1147 – 1154.
  96. Naka Y, Toda K, Kayano K, Oz MC, Pinsky DJ. Failure to Express the P – selectin gene or P – selectin blockade confers early pulmonary protection after lung ischemia or transplantation. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 1997; 94: 757 – 761.
  97. Seekamp A, Regel G, Rother K, Jutila M. The effect of anti – L – selectin (EL – 246) on remote lung injury after infrarenal ischemia/reperfusion. *Shock.* 1997; 7 (6): 447 – 454.
  98. Demertzis S, Langer F, Graeter T, Dwenger A, Georg T, Schäfers HJ. Amelioration of lung reperfusion injury by L – and E – selectin blockade. *Eur J of Cardiothorac Surg.* 1999; 16: 174 – 180.

99. Reignier J, Sellak H, Lemoine R, Lubineau A, Mazmanian GM, Detruit H *et al.* Prevention of ischemia – reperfusion lung injury by sulfated Lewis<sup>a</sup> pentasaccharide. *J Appl Physiol.* 1997; 82 (4): 1058 – 1063.
100. Ma X – L, Tsao PS, Lefer AM. Antibody to CD – 18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion. *J Clin Invest.* 1991; 88: 1237 – 1243.
101. Kapelanski DP, Iguchi A, Niles SD, Mao H – Z. Lung reperfusion injury is reduced by inhibiting a CD18 – dependent mechanism. *J Heart Lung Transplant.* 1993; 12: 294 – 307.
102. Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF *et al.* Molecular determinants of reperfusion – induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res.* 1994; 74: 336 – 343.
103. Lentsch AB, Shanley TP, Sarma V, Ward PA. In vivo suppression of NK –  $\kappa$ B and preservation of I $\kappa$ B $\alpha$  by interleukin – 10 and interleukin – 13. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2443 – 2448.
104. Sokoloski JA, Sartorelli AC, Rosen CA, Narayanan R. Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF-KB block CD11b expression and alter adhesion properties of differentiated HL-60 granulocytes. *Blood.* 1993; 82 (2): 625 – 632.