



O azul de metileno atenua a inflamação em pulmões não isquêmicos após transplante pulmonar?

Marcus da Matta Abreu^{1,a}, Francine Maria de Almeida^{1,b},
Kelli Borges dos Santos^{2,c}, Emílio Augusto Campos Pereira de Assis^{3,d},
Rafael Kenji Fonseca Hamada^{4,e}, Fabio Biscegli Jatene^{1,f},
Paulo Manuel Pêgo-Fernandes^{1,g}, Rogerio Pazetti^{1,h}

1. Departamento de Cardiopneumologia, Disciplina de Cirurgia Torácica, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.
 2. Núcleo de Pesquisa em Transplante, Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora (MG) Brasil.
 3. Departamento de Patologia, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora, Juiz de Fora (MG) Brasil.
 4. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora (MG) Brasil.
- a. <http://orcid.org/0000-0002-4910-6266>
b. <http://orcid.org/0000-0001-9755-5034>
c. <http://orcid.org/0000-0001-8423-9147>
d. <http://orcid.org/0000-0002-1326-9872>
e. <http://orcid.org/0000-0002-7540-3141>
f. <http://orcid.org/0000-0001-6175-5595>
g. <http://orcid.org/0000-0001-7243-5343>
h. <http://orcid.org/0000-0001-9823-7783>

Recebido: 28 maio 2017.

Aprovado: 7 dezembro 2017.

Trabalho realizado no Departamento de Cardiopneumologia, Disciplina de Cirurgia Torácica, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

INTRODUÇÃO

A etiologia da lesão de isquemia-reperusão (LIR) envolve primordialmente o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).^(1,2) A diminuição da oferta de oxigênio reduz a síntese e ressíntese de ATP, criando um gradiente iônico na membrana celular em razão da diminuição do transporte de cálcio ativo extracelular. O acúmulo de cálcio citoplasmático leva à ativação de uma protease que converte a xantina desidrogenase em xantina oxidase.⁽³⁾ Simultaneamente a esses eventos, há um acúmulo de AMP, que se decompõe em substâncias como adenosina, inosina e hipoxantina. Durante o processo de reperusão, na presença de oxigênio, a xantina oxidase converte a hipoxantina em ERO, como radicais superóxido, peróxido e hidroxila.^(3,4) A liberação de ERO causa inflamação e apoptose celular como resposta de fase tardia da LIR.⁽⁵⁾

RESUMO

Objetivo: Avaliar se o azul de metileno (AM) pode minimizar os efeitos da lesão de isquemia-reperusão sobre o pulmão não isquêmico em um modelo de transplante pulmonar em roedores. **Métodos:** Quarenta ratas Sprague-Dawley foram divididas em 20 doadoras e 20 receptoras. As 20 ratas receptoras foram divididas em dois grupos (n = 10) de acordo com o tratamento (solução salina a 0,9% vs. AM a 1%). Todos os animais foram submetidos a transplante pulmonar unilateral. As receptoras receberam 2 ml de solução salina ou de AM por via intraperitoneal antes do transplante. Após 2 h de reperusão, os animais foram sacrificados, e foram realizadas análises histopatológicas e imuno-histoquímicas no pulmão não isquêmico. **Resultados:** Houve diminuição significativa da inflamação — a contagem de neutrófilos e a expressão de *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1, molécula de adesão intercelular-1) foram maiores no grupo salina em comparação com o grupo AM — e da apoptose — a expressão de caspase-3 foi maior no grupo salina, e a expressão de Bcl-2 foi maior no grupo AM. **Conclusões:** O AM é uma droga eficaz para a proteção de pulmões não isquêmicos contra inflamação e apoptose após transplante pulmonar unilateral em ratos.

Descritores: Traumatismo por reperusão; Azul de metileno; Transplante de pulmão; Apoptose; Inflamação.

O azul de metileno (AM) evita a produção de ERO por atuar como um receptor alternativo de elétrons da xantina oxidase, competindo com o oxigênio molecular pela transferência de elétrons. Os elétrons são transferidos para o AM a partir do centro ferro-sulfúrico da xantina oxidase, evitando assim a conversão do oxigênio molecular em radicais superóxido.⁽⁴⁾

Anteriormente demonstramos que o AM foi capaz de reduzir os efeitos da LIR ao estudarmos pulmões transplantados de ratos.⁽⁶⁾ Alguns dos radicais livres, proteases e outros mediadores produzidos pela isquemia e reperusão após transplante pulmonar unilateral são eliminados e liberados na corrente sanguínea, e os mediadores atingem o pulmão contralateral. Existem poucos estudos sobre o efeito da LIR após transplante pulmonar único sobre o pulmão não isquêmico.⁽⁷⁾

Endereço para correspondência:

Marcus da Matta Abreu. Rua Deputado Lahyr Tostes, 365, CEP 36037-754, Juiz de Fora, MG, Brasil.
Tel./Fax: 55 32 99810-9462. E-mail: marcusdiretoria@hotmail.com

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Processo n. 2011/50715-0).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do AM como inibidor da LIR sobre pulmões direitos não isquêmicos após transplante pulmonar esquerdo em ratos.

MÉTODOS

Quarenta ratas Sprague-Dawley (300-350 g) foram utilizadas no presente estudo (20 doadoras/20 receptoras). As ratas receptoras foram divididas em dois grupos (n = 10) de acordo com o tratamento com solução salina (SAL) ou com AM, ou seja, grupo SAL e grupo AM. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa de nossa instituição (CAPPesq Processo n. 3387/09/138) e realizado segundo o Guia de Tratamento e Uso de Animais de Laboratório.⁽⁸⁾

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Doadoras

Os animais foram anestesiados com isoflurano a 5% (Isothane; Baxter, Jayuya, PR, EUA), intubados por via orotraqueal e ventilados mecanicamente (modelo 683; Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA) com volume de 10 ml/kg e frequência respiratória de 80 ciclos/min. A anestesia geral foi mantida com isoflurano a 2% (modelo Isovapor 1224; Takaoka, São Paulo, Brasil). Após laparotomia mediana, foram injetadas 500 U de heparina na veia cava inferior. Após um minuto, foi realizada esternotomia mediana, e a artéria pulmonar foi canulada para perfusão anterógrada com 20 ml de solução *low-potassium dextran* (LPD, dextrana com baixa concentração de potássio; Perfadex®; Vitrolife, Kungsbacka, Suécia) a 4°C com pressão constante (20 cmH₂O). Antes da perfusão, a veia cava inferior foi seccionada para diminuir o retorno venoso, e o apêndice atrial esquerdo foi amputado para drenar a solução LPD. Os animais foram sacrificados por exsanguinação segundo a *American Veterinary Medicine Association*.⁽⁹⁾

Após a perfusão, a traqueia dos animais foi amarrada ao final do fluxo inspiratório, e o bloco cardiopulmonar foi extraído e colocado em uma placa de Petri com LPD fria para o *back table* (preparo do enxerto). O hilo esquerdo foi dissecado, e *cuffs* foram aplicados à artéria, veia e brônquio, conforme descrito anteriormente.⁽¹⁰⁾ Os enxertos foram mantidos insuflados durante a isquemia (3 h) e foram armazenados em LPD fria até o seu implante.

Receptoras

Os animais receptores foram anestesiados, intubados e ventilados conforme descrito acima. Imediatamente antes do implante do enxerto, os animais foram injetados por via intraperitoneal com 2 ml de SAL a 0.9% ou de AM a 1%. Então, foram colocados em decúbito lateral direito e submetidos a toracotomia esquerda no 4º espaço intercostal. Posteriormente, o implante do enxerto foi realizado com auxílio de microscópio estereoscópico (modelo SZ61; Olympus, Tóquio, Japão) com aumento de 8x.⁽¹⁰⁾ Resumidamente, o hilo

esquerdo foi dissecado e ocluído o mais proximalmente possível. Então, o implante do enxerto foi realizado introduzindo-se os *cuffs* do enxerto em um pequeno orifício feito na parede ventral da artéria, veia e brônquio, respectivamente. Após a fixação dos *cuffs* com fio de sutura de seda de polipropileno 7-0, a pinça do brônquio foi aberto lentamente, e o fluxo de ar foi restabelecido. Na sequência, a pinça da veia foi removida para o estabelecimento da circulação retrógrada, e, por fim, a pinça da artéria foi aberta delicadamente, visando à perfusão suave do enxerto. O fechamento da incisão das receptoras foi realizado em camadas separadas, com fios de sutura de náilon monofilamentar 2-0. Após o término da cirurgia, os animais receberam analgesia (dipirona, 400 mg/kg) via gavagem e foram colocados sob ventilação espontânea em gaiolas individuais com livre acesso a água e comida.

Duas horas após a reperfusão do enxerto, os animais foram novamente anestesiados, intubados e colocados em ventilação mecânica, de acordo com os parâmetros mencionados anteriormente. Os animais foram submetidos a laparotomia exploratória e sacrificados por incisão da aorta abdominal anterior, com posterior extração do bloco cardiopulmonar. Em seguida, os blocos foram armazenados em solução de formaldeído a 4% por 24 h e posteriormente mantidos em solução de álcool etílico a 70% até a preparação das lâminas para análise histopatológica e imuno-histoquímica.

Análise histológica

Ambos os pulmões foram fixados por instilação traqueal de solução de formaldeído a 4% (20 cmH₂O) e armazenados por 24 h na mesma solução para análise histológica. Amostras de pulmão incluídas em parafina foram cortadas em seções de 5 µm e coradas com H&E. Utilizou-se histomorfometria pela técnica da contagem de pontos para quantificar células inflamatórias no parênquima pulmonar com grade de Weibel de 100 pontos e 50 linhas. Foram examinados dez campos microscópicos aleatórios e não coincidentes (aumento, 400x), totalizando 1.000 pontos por lâmina e cobrindo uma área de 62.500 µm² por campo.⁽¹¹⁾ A mesma metodologia foi utilizada para avaliar a expressão de *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1, molécula de adesão intercelular-1), *caspase-3* e *Bcl-2*, que foram avaliadas por meio da análise de lâminas preparadas com um método imuno-histoquímico descrito por Almeida et al.⁽¹²⁾

Análise estatística

Realizou-se análise descritiva para os dados quantitativos com distribuição normal, e os resultados foram expressos em média ± dp. A normalidade da distribuição dos dados e a homogeneidade das variâncias foram avaliadas, respectivamente, com o teste de Shapiro-Wilk e com o teste de Levene. O teste t foi utilizado para variáveis quantitativas dependentes. Considerou-se um erro tipo I de 0,05 (α) para todas as análises inferenciais.

RESULTADOS

Em relação às células inflamatórias no parênquima pulmonar, a contagem média de neutrófilos foi maior no grupo SAL em comparação com o grupo AM ($5,2 \pm 2,5\%$ vs. $2,3 \pm 0,8\%$; $p = 0,04$; Figura 1), da mesma forma que a expressão de ICAM-1 ($4,7 \pm 0,8\%$ vs. $2,7 \pm 0,7\%$; $p \leq 0,001$; Figura 2) e de caspase-3 ($4,4 \pm 1,2\%$ vs. $3,0 \pm 1,3\%$; $p \leq 0,001$; Figura 3). No entanto, a expressão de Bcl-2 no parênquima pulmonar foi maior no grupo AM em comparação com o grupo SAL ($4,9 \pm 1,9\%$ vs. $2,5 \pm 0,8\%$; $p \leq 0,001$; Figura 4).

Os dados sobre as comparações entre os pulmões não isquêmicos (pulmões direitos) e os enxertos (pulmões esquerdos) dos animais dos grupos SAL e AM são apresentados, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2.

DISCUSSÃO

A LIR pulmonar ocorre em diversos casos, como na circulação extracorpórea, transplantes pulmonares e pós-enucleação de embolia pulmonar. Recentemente, muita atenção tem sido dada à disfunção pulmonar resultante da LIR pulmonar.⁽¹³⁾

A LIR pulmonar única pode levar a lesão semelhante, mas menos grave, no pulmão contralateral. Como a lesão no pulmão não isquêmico se desenvolve apenas após a reperfusão do pulmão isquêmico, a lesão provavelmente é mediada humoralmente.⁽¹⁴⁾ Em nosso estudo, foi possível confirmar essa observação, pois os pulmões nativos apresentaram menor expressão de marcadores inflamatórios e apoptóticos tanto entre os animais submetidos à instilação de AM quanto entre os animais do grupo controle.

A lesão pulmonar contralateral induzida por isquemia pulmonar unilateral e reperfusão é um fenômeno distinto e complicado, o qual ainda não é totalmente compreendido.⁽¹⁵⁾ Alguns autores estudaram a lesão de pulmões não isquêmicos após isquemia e reperfusão do pulmão esquerdo. Zhu et al.⁽¹⁶⁾ utilizaram a apocinina, um inibidor da NADPH oxidase, em ratos submetidos a 60 min de isquemia por oclusão do hilo pulmonar esquerdo seguidos por 30 min de reperfusão. Os autores observaram que as ERO produzidas pela isquemia afetaram o pulmão não isquêmico. Georgieva et al.⁽¹⁷⁾ concluíram que um órgão lesionado afeta um órgão remoto pela liberação de mediadores humorais em um

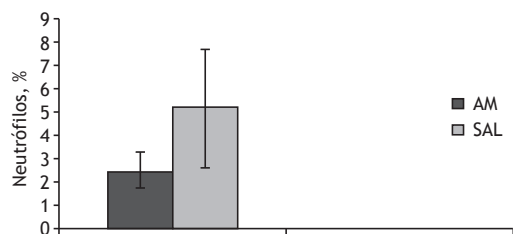


Figura 1. Infiltração de neutrófilos (%) no grupo solução salina (SAL) e no grupo azul de metileno (AM) após 3 h de isquemia fria, transplante e 2 h de reperfusão em pulmões não isquêmicos após transplante pulmonar unilateral esquerdo. $p \leq 0,001$.

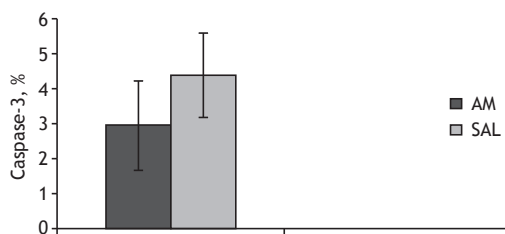


Figura 3. Atividade da caspase-3 (%) no grupo solução salina (SAL) e no grupo azul de metileno (AM) após 3 h de isquemia fria, transplante e 2 h de reperfusão em pulmões não isquêmicos após transplante pulmonar unilateral esquerdo. $p \leq 0,001$.

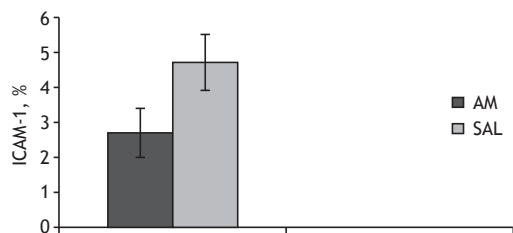


Figura 2. Atividade da *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1, molécula de adesão intercelular-1) no grupo solução salina (SAL) e no grupo azul de metileno (AM) após 3 h de isquemia fria, transplante e 2 h de reperfusão em pulmões não isquêmicos após transplante pulmonar unilateral esquerdo. $p \leq 0,001$.

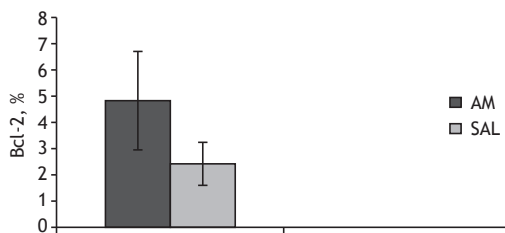


Figura 4. Atividade da Bcl-2 (%) no grupo solução salina (SAL) e no grupo azul de metileno (AM) após 3 h de isquemia fria, transplante e 2 h de reperfusão em pulmões não isquêmicos após transplante pulmonar unilateral esquerdo. $p \leq 0,001$.

Tabela 1. Comparação do grau de inflamação e apoptose entre pulmões não isquêmicos e enxertos no grupo controle.

Variáveis	Enxerto (pulmão esquerdo)	Pulmão não isquêmico (pulmão direito)	p
Neutrófilos, %	7,9 ± 2,0	5,2 ± 2,5	≤ 0,001
ICAM-1, %	8,1 ± 2,1	4,7 ± 0,8	≤ 0,001
Caspase-3, %	6,3 ± 2,9	4,4 ± 1,2	≤ 0,001
Bcl-2, %	1,2 ± 0,9	2,5 ± 0,8	≤ 0,001

ICAM-1: *intercellular adhesion molecule-1* (molécula de adesão intercelular-1).

Tabela 2. Comparação do grau de inflamação e apoptose entre pulmões não isquêmicos e enxertos no grupo azul de metileno.

Variáveis	Enxerto (pulmão esquerdo)	Pulmão não isquêmico (pulmão direito)	p
Neutrófilos, %	4,4 ± 1,4	2,3 ± 0,8	≤ 0,001
ICAM-1, %	5,1 ± 1,1	2,7 ± 0,7	≤ 0,001
Caspase-3, %	5,7 ± 1,8	3,0 ± 1,3	≤ 0,001
Bcl-2, %	2,2 ± 1,1	4,9 ± 1,9	≤ 0,001

ICAM-1: *intercellular adhesion molecule-1* (molécula de adesão intercelular-1).

modelo de isquemia e reperfusão semelhante ao do estudo de Zhu et al.⁽¹⁶⁾ Até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a avaliar esses efeitos sobre pulmões não isquêmicos após isquemia e reperfusão pulmonar induzida por transplante unilateral.

Em um estudo anterior,⁽⁶⁾ nosso grupo avaliou os efeitos do AM sobre os pulmões de ratos submetidos a transplante pulmonar unilateral. Da mesma forma que no presente estudo, o AM foi capaz de inibir a infiltração de neutrófilos de acordo com a avaliação histopatológica. Os achados de ambos os estudos mostram que o AM, por meio da inibição da produção de ERO, é capaz de reduzir a inflamação induzida pela LIR.

A apoptose é regulada por uma cascata de proteínas denominadas caspases, que são ativadas em eventos de isquemia e reperfusão. A isquemia e reperfusão pulmonar têm um efeito direto sobre as células pulmonares, e o aumento da atividade da caspase-3 refletiu um maior número de células apoptóticas.⁽¹⁸⁾

As vias de sinalização que levam à apoptose são mantidas por reguladores positivos e negativos. As proteínas que promovem a sobrevivência são as proteínas apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL.⁽¹⁹⁾ A liberação de ERO causa apoptose celular como resposta de fase tardia da LIR. O estresse oxidativo desencadeia a ativação da caspase-3, levando à apoptose celular. Além disso, o equilíbrio das proteínas anti e pró-apoptóticas responde dramaticamente às ERO.⁽⁵⁾ A diminuição da expressão de Bcl-2 e o aumento da expressão de caspase-3 no presente estudo são semelhantes aos encontrados por Abogresha et al.,⁽⁵⁾ que utilizaram a vitamina C como agente antioxidante, protegendo contra os efeitos da lesão pancreática após isquemia renal. Os achados do presente estudo mostram a indução de apoptose

como resultado da LIR após transplante pulmonar e a capacidade do AM para inibir sua ocorrência.

As moléculas de adesão das células endoteliais parecem desempenhar um papel importante na LIR por causarem a adesão dos leucócitos às células endoteliais. A ICAM-1 é uma das moléculas de adesão que demonstraram ser reguladas positivamente em resposta às citocinas. Essa regulação positiva leva à adesão de leucócitos-células endoteliais e à infiltração de neutrófilos no tecido afetado. Meyer et al.⁽²⁰⁾ realizaram 45 min de isquemia hepática seguidos por 5 h de reperfusão e mostraram uma significativa regulação positiva da ICAM-1 em órgãos distantes, como o coração, rim, intestino e pâncreas. No presente estudo, foi possível identificar maior expressão de ICAM-1 nos pulmões dos ratos do grupo SAL em comparação com os do grupo AM, bem como maior contagem de neutrófilos, o que representa um processo inflamatório menos intenso nos animais tratados com AM.

Como limitação do nosso estudo, podemos destacar que utilizamos a mesma dose de AM em todos os casos. O AM tem efeito dose-dependente, e um estudo com diferentes doses poderia ter produzido resultados diferentes dos encontrados no presente estudo. Além disso, a monitoração dos parâmetros hemodinâmicos, dos marcadores de perfusão tecidual e dos parâmetros ventilatórios pode ser útil para uma melhor compreensão da ação do AM.

Até onde sabemos, o presente estudo demonstra pela primeira vez que o AM é uma droga eficaz para a proteção de pulmões não isquêmicos contra inflamação e apoptose após transplante pulmonar unilateral em ratos.

REFERÊNCIAS

- Jatene FB, Pego-Fernandes PM. Challenges in lung transplantation. *J Bras Pneumol.* 2008;34(5):249-50. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132008000500001>
- Arcasoy SM, Fisher A, Hashem RR, Scavuzzo M, Ware LB; ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part V: predictors and outcomes. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(10):1483-8. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2004.11.314>
- den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, de Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(5):H1283-99. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00251.2010>
- Greca FH, Gonçalves NM, Souza Filho ZA, Noronha Ld, Silva RF, Rubin MR. The protective effect of methylene blue in lungs, small bowel and kidney after intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras.* 2008;23(2):149-56. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502008000200007>
- Abogresha NM, Greish SM, Abdelaziz EZ, Khalil WF. Remote effect of kidney ischemia-reperfusion injury on pancreas: role of oxidative stress and mitochondrial apoptosis. *Arch Med Sci.* 2016;12(2):252-62. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.48130>
- Abreu Mda M, Pazetti R, Almeida FM, Correia AT, Parra ER, Silva LP, et al. Methylene blue attenuates ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *J Surg Res.* 2014;192(2):635-41. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.07.043>
- Watanabe A, Kawaharada N, Kusajima K, Komatsu S, Takahashi H. Contralateral lung injury associated with single-lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 1996;62(6):1644-9. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(96\)00810-7](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(96)00810-7)
- National Research Council; Division on Earth and Life Studies; Institute for Laboratory Animal Research; Commission on Life Sciences. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [monograph on the Internet]. Washington, DC: The National Academies Press; 1996 [cited 2010 Jan 22]. Available from: <https://>

- www.nap.edu/catalog/5140/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals
9. Beaver BV, Reed W, Leary S, McKiernan B, Bain F, Schultz R, et al. Report of the AVMA panel on euthanasia. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;218:669-696. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.218.669>
 10. Mizuta T, Kawaguchi A, Nakahara K, Kawashima Y. Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989;97(4):578-81.
 11. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, et al. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;35(4):457-65. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0391OC>
 12. Almeida FM, Oliveira-Junior MC, Souza RA, Petroni RC, Soto SF, Soriano FG, et al. Creatine supplementation attenuates pulmonary and systemic effects of lung ischemia and reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant.* 2016;35(2):242-50. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2015.06.012>
 13. Zhao Q, Wu J, Hua Q, Lin Z, Ye L, Zhang W, et al. Resolvin D1 mitigates energy metabolism disorder after ischemia-reperfusion of the rat lung. *J Transl Med.* 2016;14:81. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0835-7>
 14. Palazzo R, Hamvas A, Shuman T, Kaiser L, Cooper J, Schuster DP. Injury in nonischemic lung after unilateral pulmonary ischemia with reperfusion. *J Appl Physiol* (1985). 1992;72(2):612-20. <https://doi.org/10.1152/jappl.1992.72.2.612>
 15. Yeh DY, Tung SP, Fu YH, Yang YC, Wang JJ. Intravenous superoxide dismutase administration reduces contralateral lung injury induced by unilateral lung ischemia and reperfusion in rats through suppression of activity and protein expression of matrix metalloproteases. *Transp Proc.* 2015;47(4):1083-6. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.10.060>
 16. Zhu C, Bilali A, Georgieva GS, Kurata S, Mitaka C, Imai T. Salvage of nonischemic control lung from injury by unilateral ischemic lung with apocynin, a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase inhibitor, in isolated perfused rat lung. *Transl Res.* 2008;152(6):273-82. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2008.10.008>
 17. Georgieva GS, Kurata S, Ikeda S, Eishi Y, Mitaka C, Imai T. Nonischemic lung injury by mediators from unilateral ischemic reperfusion: ameliorating effect of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme inhibitor. *Shock.* 2007;27(1):84-90. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000235131.89986.45>
 18. Forgiarini LA, Grün G, Kretzman NA, Kretzmann NA, de Mu-oz GA, de Almeida A, Forgiarini LF, et al. When is injury potentially reversible in a lung ischemia-reperfusion model? *J Surg Res.* 2013;179(1):168-74. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.08.026>
 19. Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:590987.
 20. Meyer K, Brown MF, Zibari G, Panes J, McMillan RW, McDonald JC, et al. ICAM-1 upregulation in distant tissues after hepatic ischemia/reperfusion: a clue to the mechanism of multiple organ failure. *J Pediatr Surg.* 199;33(2):350-3.