

Lesão pulmonar de reperfusão por oclusão da aorta abdominal: modelo experimental em ratos*

BRUNO DO VALLE PINHEIRO¹, CÂNDIDA MARIA MOREIRA HORTA², BRUNO GUEDES BALDI³,
LEONARDO DE LUCCA SCHIAVON³, ÂNGELA MARIA GOLLNER⁴, JÚLIO CÉSAR ABREU DE OLIVEIRA⁵

Introdução: Procedimentos cirúrgicos com oclusão da aorta têm sido associados a lesão pulmonar de reperfusão. O objetivo deste trabalho foi estudar a presença de edema pulmonar em um modelo de lesão de reperfusão por oclusão da aorta em ratos. **Material e métodos:** 33 ratos *Wistar* foram anestesiados com tiopental sódico (20mg/kg, via intraperitoneal), seguindo-se laparotomia por incisão mediana, para isolamento da aorta e cava inferior. A seguir, os animais foram randomizados em três grupos. Grupo isquemia-reperfusão (GIR, n = 5): animais submetidos a 30min de oclusão dos vasos, seguindo-se 120min de reperfusão. Grupo isquemia (GI, n = 5): animais submetidos a 30min de oclusão dos vasos. Grupo controle (GC, n = 5): animais submetidos apenas ao procedimento cirúrgico, sem oclusão dos vasos, acompanhados por 150min. Após o sacrifício, em 15 animais foram realizados estudos histopatológicos dos pulmões. Para caracterização de edema, foi realizada a análise morfométrica por contagem de pontos, determinando-se o índice de edema alveolar. Realizou-se também uma análise semiquantitativa da infiltração de polimorfonucleares nos pulmões. Em 18 animais retirou-se o pulmão direito para a determinação da relação entre os pesos úmido e seco. O índice de edema alveolar e a relação peso úmido/peso seco foram comparados entre os grupos através de ANOVA, com a correção de Bonferroni para comparação entre os grupos dois a dois. **Resultados:** Os animais do GIR apresentaram maior edema alveolar em relação aos do GI e GC (0,24; 0,18; 0,17; respectivamente, com p < 0,001). Não houve diferenças nas relações peso úmido/peso seco dos três grupos. Houve maior infiltração de células inflamatórias nos pulmões dos ratos submetidos a isquemia-reperfusão. Os autores concluem que a oclusão e desocclusão da aorta infra-renal está associada à lesão pulmonar. Essa lesão não foi induzida pela elevação da pressão hidrostática na circulação pulmonar em função da oclusão da aorta, pois ela não foi encontrada no grupo submetido apenas à isquemia.

(*J Pneumol* 2000;26(4):163-168)

Pulmonary reperfusion injury by aortic occlusion: experimental model in rats

Introduction: Surgical procedures requiring aortic occlusion have been associated with pulmonary reperfusion injury. The authors studied the pulmonary edema in a reperfusion injury model by aortic occlusion in rats. **Material and methods:** Thirty-three Wistar rats were anesthetized with intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (20 mg/kg). Using a midline abdominal incision, the infra-renal aorta was isolated and the animals were randomized into three groups. Ischemia-reperfusion group (IRG, n = 5): rats that underwent 30 min of aorta occlusion and were followed during 120 min of reperfusion. Ischemia group (IG, n = 5): rats that underwent 30 min of aorta occlusion. Control group (CG, n = 5): rats that underwent sham operations without aorta occlusion and were followed during 150 min. Histopathologic examination of the right lung

* Trabalho realizado na Universidade Federal de Juiz de Fora.

1. Professor Substituto da Disciplina de Pneumologia; Médico Intensiva da Unidade de Terapia Intensiva.
2. Médica da Disciplina de Pneumologia.
3. Estagiário do Programa de Iniciação Científica.
4. Professor Adjunto e Chefe do Departamento de Patologia.

5. Professor Adjunto da Disciplina de Pneumologia; Chefe da Unidade de Terapia Intensiva.

Apoio: Fapemig

Endereço para correspondência – Bruno do Valle Pinheiro, Rua Benjamin Constant, 1.073/401 – 36040-015 – Juiz de Fora, MG. E-mail: hsbvp@nutecnet.com.br

Recebido para publicação em 28/9/99. Reapresentado em 10/1/00. Aprovado, após revisão, em 24/4/00.

was performed. The pulmonary edema was studied by morphometric analysis and so was the leukocytes infiltration. Eighteen rats (6 rats in each group) were studied with respect to lung fresh/dry weight ratio. ANOVA was used to analyze the morphometric results and the lung fresh/dry weight ratio, with Bonferroni adjustment for paired multiple comparisons. Animals of the IRG presented more pulmonary edema than those of the IG and CG (0.24 vs. 0.17 and 0.17, $p < 0.001$). There was no difference between the groups regarding the lung fresh/dry weight ratio. There were more inflammatory cells in the lungs of the rats submitted to ischemia-reperfusion. The authors concluded that infra-renal abdominal aorta cross-clamping and unclamping are associated with pulmonary edema. This edema is not induced by elevation of the hydrostatic pressure due to the aortic occlusion, since it was not seen in animals that were only submitted to ischemia.

Descritores – isquemia, reperfusão, edema pulmonar, ratos de cepas endogâmicas

Key words – ischemia, reperfusion, pulmonary edema, inbred strains rats

Siglas e abreviaturas utilizadas neste trabalho

GIR – Grupo isquemia-reperfusão

GI – Grupo isquemia

GC – Grupo controle

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

ERTO – Espécies reativas tóxicas do oxigênio

INTRODUÇÃO

A isquemia, condição de interrupção no suprimento de oxigênio e nutrientes para uma determinada área, induz invariavelmente a disfunção e posterior morte de tecidos. Essa lesão ocorre em diferentes intervalos de tempo, dependendo das características do tecido envolvido (capacidade de recrutamento capilar na microcirculação, demanda metabólica, estoques de oxigênio disponíveis, capacidade de produção de energia por metabolismo anaeróbico)^(1,2). Mais recentemente, surgiram evidências de que a lesão dos tecidos não está limitada à isquemia, podendo estender-se com a reperfusão. Parks e Granger demonstraram que três horas de isquemia seguidas de uma hora de reperfusão determinavam maior lesão na mucosa intestinal do que quatro horas de isquemia⁽³⁾. Além disso, Korthuis *et al.*⁽⁴⁾ mostraram que a reperfusão anóxica de tecidos isquêmicos resulta em menores danos do que aquela realizada na presença do oxigênio. Isso sugere a participação do oxigênio fornecido na reperfusão entre os mecanismos de agressão tecidual. A lesão de isquemia-reperfusão, também chamada de lesão de reperfusão, pode ser definida como o dano que ocorre em determinado tecido com a restauração do fluxo sanguíneo, após um período de isquemia⁽⁵⁾. O seu reconhecimento é importante para que se possa proceder à reversão da isquemia, ponto fundamental para a manutenção da viabilidade do tecido, de modo menos lesivo.

A reperfusão pode lesar isoladamente o órgão isquemiado e depois reperfundido, como ocorre, por exemplo, na reperfusão miocárdica e nos transplantes de órgãos^(6,7). Entretanto, os danos da reperfusão podem estender-se para órgãos localizados a distância, em função de uma resposta inflamatória sistêmica, na qual mediadores inflamatórios (espécies reativas tóxicas do oxigênio, metabóli-

tos do ácido araquidônico, produtos do complemento) são produzidos e liberados na circulação, alcançando diferentes órgãos. Nos pulmões, esses mediadores inflamatórios podem lesar, diretamente ou através da quimiotaxia de polimorfonucleares, a membrana alvéolo-capilar, determinando o surgimento do edema pulmonar, o qual pode estar presente em situações de isquemia-reperfusão a distância, como no pós-operatório de cirurgias com pinçamento temporário da aorta e nas condições de choque circulatório^(8,9).

O objetivo deste trabalho foi determinar se a isquemia-reperfusão, por oclusão temporária da aorta abdominal em ratos, é capaz de induzir a formação de edema pulmonar, criando-se assim um modelo experimental para o estudo deste evento e de possíveis medidas terapêuticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa Experimental da Disciplina de Farmacologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), de acordo com a lei de experimentação animal, nº 6.638, de 1979. Foram utilizados 33 ratos *Wistar*, machos, de idade entre 12 e 16 semanas, pesando entre 250 e 300g, procedentes do Biotério Central da UFJF.

Os experimentos foram realizados em duas etapas distintas. Na primeira etapa, os animais (15 ratos) foram anestesiados inicialmente com 20mg/kg de tiopental sódico, administrados por via intraperitoneal, sendo mantidos em decúbito dorsal, em ventilação espontânea. Doses suplementares de 10mg/kg foram administradas, por via intraperitoneal, conforme a necessidade. Em seguida, realizou-se tricotomia da parede abdominal, seguida de lapa-

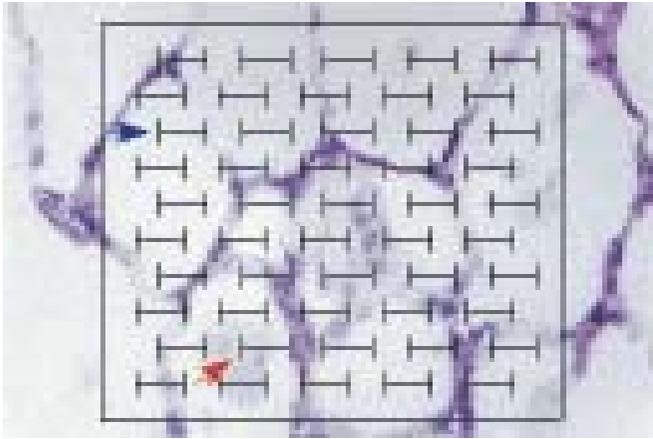


Figura 1 – Esquema da análise morfométrica, com a seta azul ilustrando um ponto sobre um alvéolo sem edema e, a vermelha, um ponto sobre um alvéolo com edema (aumento de 400x)

rotomia com incisão mediana. Após a incisão, procedeu-se à abertura do retroperitônio para isolamento da aorta e cava inferior, abaixo da emergência das artérias renais. Após o isolamento dos vasos, os animais foram randomizados em três grupos. Grupo isquemia-reperfusão (GIR, n = 5): procedeu-se à oclusão da aorta e veia cava inferior por 30min, através de pinçamento abaixo da emergência das artérias renais. Em seguida foi realizado o despinçamento e fechamento da parede abdominal. Seguiram-se 120min de reperfusão, com posterior sacrifício dos animais por secção da aorta. Grupo isquemia (GI, n = 5): procedeu-se à oclusão dos vasos por 30min, através de pinçamento dos mesmos abaixo da emergência das artérias renais. Posteriormente, os animais foram sacrificados por secção da aorta. Grupo controle (GC, n = 5): aorta e veia cava inferior foram mantidas isoladas por 30min, seguindo-se fechamento da parede abdominal. Os animais foram acompanhados por mais 120min, sendo sacrificados por secção da aorta.

Após o sacrifício dos animais, procedeu-se à toracotomia mediana para retirada dos pulmões em bloco. Em seguida, os mesmos foram insuflados com injeção de formol a 10% através de suas traquéias e armazenados na mesma solução. Foram retirados fragmentos dos lobos inferiores para cortes histológicos, corados pela hematoxilina-eosina, para estudo de edema pulmonar e presença de células inflamatórias. A caracterização do edema pulmonar foi feita por estudo morfométrico, através da técnica de contagem de pontos⁽¹⁰⁾. Utilizou-se uma ocular com retículo composto de 50 traços de 1mm de extensão (10 linhas com 5 traços cada uma), contendo um ponto em cada extremidade, perfazendo um total de 100 pontos. Foram analisados 10 campos de cada corte histológico, escolhidos aleatoriamente no aumento de 400 vezes, contando-se 30 pontos em cada campo (os pontos da tercei-

ra, sexta e nona linhas). O índice de edema alveolar foi determinado pela razão entre o número de pontos que caíram sobre área de edema intra-alveolar e o número de pontos que caíram no interior de alvéolo⁽¹¹⁾. A Figura 1 ilustra o método de contagem de pontos.

Para estudar a presença de células inflamatórias foi utilizado um método semiquantitativo, no qual um patologista analisou “cegamente” dez campos de cada corte histológico, escolhidos aleatoriamente no aumento de 400 vezes. Os achados foram graduados: 1+, infiltrado discreto de células polimorfonucleares em septos ou espaços alveolares; 2+, infiltrado moderado de células polimorfonucleares nos septos ou espaços alveolares; 3+, infiltrado intenso de células polimorfonucleares nos septos ou espaços alveolares; 0, ausência de infiltrado.

Na segunda etapa, 18 animais, também randomizados em GIR (n = 6), GI (n = 6) e GC (n = 6), foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais até o sacrifício e retirada dos pulmões por toracotomia. Após a retirada dos pulmões, o pulmão direito foi separado das estruturas mediastinais e pesado em balança analítica de precisão de 0,001g, obtendo-se o peso úmido. Para a determinação do peso seco, o pulmão direito foi colocado em estufa de secagem e esterilização por 72 horas e novamente pesado, obtendo-se o peso seco.

Análise estatística: Foi utilizada a ANOVA para a comparação do índice de edema alveolar e relação entre os pesos úmidos e secos entre os três grupos. Procedeu-se à correção de Bonferroni para as comparações entre os grupos dois a dois. Considerou-se significância estatística com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os pesos dos animais dos grupos GIR, GI e GC, em ambas as etapas do experimento, não foram estatisticamente diferentes (Tabela 1).

TABELA 1
Peso, em gramas (g), dos animais dos grupos isquemia-reperfusão (GIR), isquemia (GI) e controle (GC), nas duas etapas de experimentação

Primeira etapa				Segunda etapa			
Ratos	GIR	GI	GC	Ratos	GIR	GI	GC
1	290	310	290	1	300	280	300
2	350	300	280	2	300	300	270
3	270	275	270	3	250	270	270
4	300	300	300	4	260	280	250
5	300	275	340	5	300	270	290
				6	300	270	300
Média	302	292	296	Média	285	278	280
DP	30	16	27	DP	25	12	20

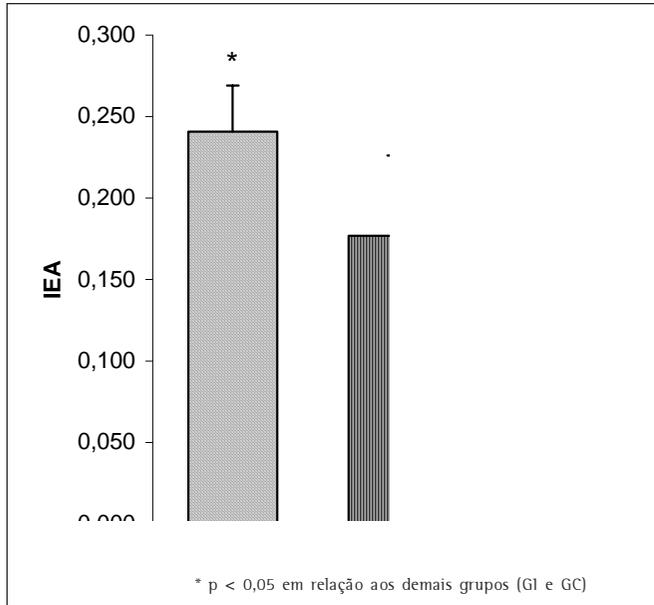


Figura 2 – Índice de edema alveolar (IEA, valores expressos em média ± desvio padrão) nos grupos isquemia-reperusão (GIR), isquemia (GI) e controle (GC)

Houve maior edema alveolar nos animais submetidos a 30min de isquemia e 120min de reperusão, em relação àqueles submetidos apenas à isquemia e àqueles do grupo controle (índices de edema alveolar à morfometria de 0,24; 0,18; 0,17; respectivamente, com $p < 0,001$). Esse resultado está ilustrado na Figura 2. Não houve diferença em relação ao índice de edema alveolar entre os grupos isquemia e controle.

A Tabela 2 mostra a infiltração de polimorfonucleares nos septos e alvéolos dos ratos dos diferentes grupos, sendo mais intensa nos animais do GIR.

Não houve diferença nas relações entre os pesos úmido e seco dos pulmões dos ratos dos grupos GIR, GI e GC, conforme demonstrado na Figura 3.

TABELA 2

Infiltração de polimorfonucleares, quantificada em cruces, nos alvéolos (A) e septos alveolares (S) dos animais dos grupos isquemia-reperusão (GIR), isquemia (GI) e controle (GC), nas duas etapas de experimentação

Rato	GIR		GI		GC	
	A	S	A	S	A	S
1	++	++	+	++	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	++	++	0	0	+	+
4	+++	++	+	+	0	0
5	+	+			+	+

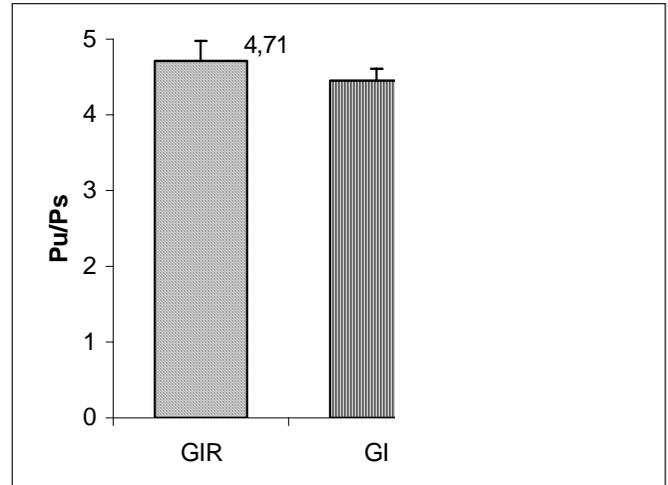


Figura 3 – Relação entre os pesos úmido e seco (Pu/Ps, valores expressos em média ± desvio padrão) nos grupos isquemia-reperusão (GIR), isquemia (GI) e controle (GC)

DISCUSSÃO

A lesão pulmonar de reperusão após oclusão e desocclusão da aorta já foi demonstrada em diferentes trabalhos experimentais e clínicos. Anner *et al.* encontraram áreas de edema alveolar à microscopia em cães submetidos a isquemia, por oclusão da aorta por quatro horas, com posterior reperusão por outras quatro horas⁽¹²⁾. Klausner *et al.*, utilizando um modelo de isquemia-reperusão em ovelhas, através da insuflação por duas horas de um torniquete nos membros posteriores dos animais, encontraram, ao final de duas horas de reperusão, focos de edema pulmonar à histologia⁽¹³⁾. Nielsen *et al.*, em modelo de isquemia-reperusão em coelhos, através da insuflação de um cateter de Fogarty na aorta torácica durante 40min, também encontraram edema pulmonar, detectado pelo aumento da relação entre os pesos úmido e seco do órgão⁽¹⁴⁾.

Entre os estudos clínicos, Paterson *et al.* estudaram 20 pacientes submetidos a cirurgia eletiva para correção de aneurisma da aorta abdominal. Todos apresentaram disfunção respiratória no pós-operatório, manifestada por aumentos do *shunt* e do pico de pressão inspiratória. Em 16 pacientes identificou-se edema pulmonar em radiografias de tórax realizados entre quatro e oito horas após a cirurgia, período durante o qual a pressão de oclusão da artéria pulmonar se manteve ao redor de 12mmHg, mostrando a característica não hidrostática do edema⁽¹⁵⁾. Esses mesmos autores, estudando prospectivamente pacientes submetidos a cirurgia para correção de aneurisma de aorta infra-renal, mostraram os efeitos benéficos da administração de manitol, em comparação com a solução salina, na prevenção da lesão pulmonar de reperusão. O manitol é capaz de inativar as espécies reativas tóxicas do

oxigênio, sobretudo o radical hidroxila, e inibir a síntese de tromboxana B₂, importantes mediadores na lesão inflamatória produzida pela reperfusão⁽¹⁶⁾.

Esse modelo experimental de oclusão temporária da aorta abdominal em ratos foi elaborado a partir de outro semelhante, desenvolvido na Disciplina de Pneumologia da Escola Paulista de Medicina, em que uma série de trabalhos em cães demonstraram que a oclusão da aorta em sua porção supracelíaca por uma hora, seguida de reperfusão de uma hora, determina edema pulmonar com comprometimento nas trocas gasosas, alterações hemodinâmicas e na utilização do oxigênio pelos tecidos. Nesse modelo, a utilização da N-acetilcisteína, uma droga com ação “varredora” das espécies reativas tóxicas do oxigênio, mediadores importantes na lesão de reperfusão, protegeu contra o edema pulmonar e a piora nas trocas gasosas pulmonares⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

A lesão de reperfusão obtida neste modelo de oclusão temporária da aorta abdominal em ratos ficou demonstrada pelo maior edema alveolar presente nos animais submetidos a 30min de isquemia e 120min de reperfusão, quando comparados com aqueles submetidos somente à isquemia, ou aos animais do grupo controle. Não tivemos como objetivo estudar os mecanismos da lesão de reperfusão, nem os possíveis mediadores participantes. Preocupamo-nos, todavia, em caracterizar que este edema não foi decorrente do aumento da pressão hidrostática na circulação pulmonar, fenômeno este que pode ocorrer durante a oclusão da aorta. Para tanto, realizamos o grupo isquemia, com o sacrifício dos animais após 30min de oclusão da aorta. O menor edema alveolar neste grupo, em comparação com o grupo isquemia-reperfusão, confirma que o edema se desenvolveu na reperfusão, não sendo, portanto, por aumento de pressão hidrostática.

Além disso, a presença de maior número de polimorfonucleares nos pulmões dos ratos do GIR reforça a origem inflamatória do edema. O acúmulo dessas células inflamatórias nos pulmões deve-se à produção de mediadores inflamatórios pelos tecidos isquemiados e reperfundidos. Entre esses mediadores destacam-se os leucotrienos, tromboxana, o fator de necrose tumoral e a enzima xantina-oxidase. Uma vez atraídos aos pulmões e ativados, os neutrófilos são capazes de lesar o órgão a partir da produção de enzimas proteolíticas e espécies reativas tóxicas do oxigênio^(1,5,8,9).

Neste trabalho, não encontramos diferenças nas relações entre pesos úmido e seco nos diferentes grupos. Esse achado pode ter sido devido a menor sensibilidade deste método em detectar pequenos níveis de edema pulmonar. Resultado semelhante a esse foi descrito por Anner *et al.*, estudando cães submetidos a quatro horas de isquemia e acompanhados por quatro horas de reperfusão, por oclusão da aorta abaixo da emergência das artérias renais,

em que a demonstração de acúmulo de neutrófilos e áreas de edema alveolar não se acompanhou de alterações na relação peso úmido e peso seco⁽¹²⁾.

Os mecanismos fisiopatológicos da lesão de reperfusão não estão totalmente estabelecidos. A proteção contra a lesão de reperfusão através do bloqueio de diferentes mediadores e células inflamatórias mostra sua natureza multifatorial. Entre esses mediadores, as espécies reativas tóxicas do oxigênio (ERTO) apresentam importante papel, lesando diretamente a membrana celular ou promovendo a ativação de outros mediadores e células inflamatórias. Na lesão pulmonar de reperfusão a partir de tecidos localizados a distância, como nesse modelo, as ERTO podem ser geradas a partir dos neutrófilos recrutados e ativados nos pulmões ou a partir da enzima xantina-oxidase. A xantina-oxidase é uma enzima gerada a partir da xantina-deidrogenase sob condições de isquemia tecidual. A xantina-oxidase metaboliza a hipoxantina, produzida também durante a isquemia de tecidos, em função da degradação de ATP para o fornecimento de energia, gerando como subprodutos as ERTO. Entretanto, esse metabolismo exige a presença do oxigênio, fornecido pela reperfusão, motivo pelo qual ela amplifica a lesão iniciada pela isquemia⁽²¹⁾.

Concluimos que esse nosso modelo experimental em ratos, no qual a oclusão da aorta abdominal durante 30min, seguida de reperfusão de 120min, induz a lesão pulmonar, com edema alveolar e infiltração de células inflamatórias, constitui um modelo para o estudo dos mecanismos da lesão pulmonar de reperfusão e de possíveis medidas terapêuticas para minimizar essa lesão.

REFERÊNCIAS

1. Scannell G. Leukocyte responses to hypoxic/ischemic conditions. *New Horiz* 1996;4:179-183.
2. Gutierrez G, Brown SD. Gastrointestinal tonometry: a monitor of regional dysoxia. *New Horiz* 1996;4:413-419.
3. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250:G749-753.
4. Korthuis RJ, Smith JK, Carden DL. Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. *Am J Physiol* 1989;256:H315-319.
5. Reily PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;161:488-503.
6. Becker LC, Ambrosio G. Myocardial consequences of reperfusion. *Prog Cardiovasc Dis* 1987;30:23-44.
7. Horiguchi T, Harada Y. The effect of protease inhibitor on reperfusion injury after unilateral pulmonary ischemia. *Transplantation* 1993;55:254-258.
8. Klausner JM, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Oxygen free radicals mediate ischemia-induced lung injury. *Surgery* 1989;105:192-199.
9. Ar'rajab A, Dawidson I, Fabia R. Reperfusion injury. *New Horiz* 1996;4:224-234.
10. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 1963;12:131-155.

11. Lichtenstein A. Evolução da lesão pulmonar aguda na pancreatite necro-hemorrágica em ratos: papel da pressão e dos sais biliares no ducto pancreático. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
12. Anner H, Kaufman Jr. RP, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pulmonary hypertension and leukosequestration after lower torso ischemia. *Ann Surg* 1987;206:642-648.
13. Klausner JM, Anner H, Paterson IS, et al. Lower torso ischemia-induced lung injury is leukocyte dependent. *Ann Surg* 1988;208:761-767.
14. Nielsen VG, Tan S, Weinbroum A, et al. Lung injury after hepatoenteric ischemia-reperfusion: role of xanthine oxidase. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1364-1369.
15. Paterson IS, Klausner JM, Pugatch R, et al. Noncardiogenic pulmonary edema after abdominal aortic aneurysm surgery. *Ann Surg* 1989;209:231-236.
16. Paterson IS, Klausner JM, Goldman G, et al. Pulmonary edema after aneurysm surgery is modified by mannitol. *Ann Surg* 1989;210:796-801.
17. Holanda MA, Pinheiro BV, Araújo FG, Percário S, Romaldini H. N-acetylcysteine effect in dogs submitted to ischemia-reperfusion (I-R) syndrome by aortic occlusion. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:A812.
18. Holanda MA. Ação da N-acetilcisteína na isquemia-reperusão por oclusão da aorta em cães: alterações hemodinâmicas, respiratórias, metabólicas e do estresse oxidativo. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1998.
19. Pinheiro BV, Holanda MA, Araújo FG, Ferreira RG, Romaldini H. Effects of N-acetylcysteine (NAC) on lung gas exchange, lipid peroxidation and histopathological findings in dogs submitted to the reperfusion injury by aortic occlusion. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:A582.
20. Pinheiro BV. Repercussões da lesão de reperusão por oclusão temporária supracelíaca da aorta em cães. Efeitos da N-acetilcisteína. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1997.
21. Pinheiro BV, Holanda MA, Araújo FG, Romaldini H. Lesão pulmonar de reperusão. *J Pneumol* 1999;25:124-136.