

A desferoxamina e seu efeito protetor na preservação pulmonar

Luiz Sérgio FRAGOMENI*, Robert S. BONSER**, Brian EDWARDS**, Stuard W. JAMIESON**, Michael P. KAYE**

RBCCV 44205-99

FRAGOMENI, L. S.; BONSER, R. S.; EDWARDS, B.; JAMIESON, S. W.; KAYE, M. P. — Desferoxamina e seu efeito protetor na preservação pulmonar. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, 4(3): 237-241, 1989.

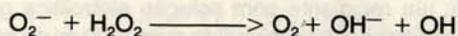
RESUMO: Há recentes evidências de que radicais livres derivados do oxigênio estão envolvidos na lesão tecidual decorrente de isquemia e subsequente reperfusão. A desferoxamina (DF), evitando a produção de radicais hidroxila e eliminando o ânion superóxido, pode atenuar este dano, sendo seus efeitos aqui avaliados após quatro horas de preservação pulmonar hipotérmica. O auto-transplante pulmonar esquerdo foi realizado em 12 cães mestiços. O pulmão foi, inicialmente, perfurado com 1000 ml de solução de Collins modificada e mantido insuflado, colocado sob refrigeração (4°C) em solução salina durante quatro horas. Seis cães receberam 500 mg de DF administrados E.V. durante o período isquêmico e imediatamente após iniciar a reperfusão. Após reimplante e ligadura da artéria pulmonar direita, os animais foram mantidos numa FiO_2 fixa (49%) e monitorizados por quatro horas. Durante a primeira hora pós-reperfusão, o pO_2 arterial foi significativamente superior no grupo tratado com DF ($p < 0.05$). O gradiente alvéolo-arterial foi também inferior ($p < 0.05$). A resistência vascular pulmonar foi semelhante em ambos os grupos. Concluímos que a desferoxamina permite melhor troca gasosa no período imediatamente após reperfusão e que sua investigação, na área da preservação pulmonar, deve ser estimulada.

DESCRIPTORIOS: proteção pulmonar, desferoxamina; radicais livres.

INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos, vários pesquisadores têm tentado explicar e relacionar as alterações fisiopatológicas associadas com a reperfusão de tecido celular submetido a isquemia. Existem evidências de que os radicais livres de oxigênio são, pelo menos em parte, responsáveis pelo dano celular decorrente da reoxigenação de tecidos que foram submetidos a hipóxia^{1, 12, 14}. Órgãos como intestino delgado, estômago, fígado, pâncreas, músculo esquelético, rim e cérebro são afetados pela isquemia e subsequente reperfusão. Com o acúmulo de interesse no campo dos transplantes cardíaco e cardiopulmonar, as alterações causadas por isquemia e reperfusão do miocárdio e tecido pulmonar têm sido, atualmente, mais intensamente investigadas^{2, 7, 16, 18}.

Entre todos os radicais livres derivados do oxigênio envolvidos na lesão isquêmica e de reperfusão, acredita-se que o radical hidroxila ($^{\cdot}OH$) é o mais citotóxico, devido à sua capacidade de destruir biomoléculas, especialmente as membranas lipídicas^{9, 12, 17}. A formação de maior quantidade de radicais hidroxila é proporcionado pela reação de Haber-Weiss, que, por sua vez, é catalizada pelo íon férrico^{5, 9}.



Teoricamente, sem a presença de Fe^{2+} , esta reação é bem mais lenta e a formação do radical hidroxila será menos intensa.

Trabalho realizado no Minnesota Heart and Lung Institute. Minneapolis, Minnesota, USA.

Recebido para publicação em 3 de novembro de 1990.

* Do Minnesota Heart and Lung Institute (Professor Convidado).

** Do Minnesota Heart and Lung Institute.

Endereço para separatas: Luiz Sérgio Fragomeni. Rua Uruguai, 1555, apt: 41. 96010 Passo Fundo, RS, Brasil.

A desferoxamina⁴, sendo um quelante do íon férrico, é uma potente inibidora do radical hidroxila durante períodos de isquemia e subsequente reperfusão.

Baseados nessa hipótese, realizamos um modelo canino de auto-transplante pulmonar, no qual observamos os benefícios do quelante do ferro desferoxamina na prevenção de lesão isquêmica e de reperfusão.

MATERIAL E MÉTODO

Doze cães mestiços pesando em média 27 k foram anestesiados com tiamilal sódico (Biotal, 15-20 mg/k E. V.) e paralizados com suxametônio. O primeiro grupo de animais (n = 6 controle), após colocação de tubo endotraqueal, foram conectados ao respirador Servo 900, com volume minuto de 20 ml/k e 12 movimentos respiratórios por minuto. A fração inspirada de O₂ foi mantida a 40% com pressão expiratória positiva final de 5 cm de água, durante o experimento. Um cateter arterial 5F para monitorização da pressão arterial foi colocado na carótida direita e um cateter de Swan-Ganz 7F, introduzido na veia jugular direita e orientado até o tronco pulmonar para medida de débito cardíaco (DC) pelo método de termodiluição. A pressão do átrio esquerdo foi medida através de cateter colocado sob visão direta.

O procedimento cirúrgico foi realizado através de toracotomia esquerda. Após dissecação do brônquio principal esquerdo, o pericárdio foi aberto anteriormente às veias pulmonares, expondo a artéria pulmonar esquerda. Após sua dissecação, a artéria pulmonar direita também foi exposta e reparada com fita umbelical, através do seio transverso, a fim de permitir o seu posterior pinçamento e ligadura. As veias pulmonares foram expostas, identificando-se sua comunicação com o átrio esquerdo.

Após heparinização sistêmica com 300 unidades de heparina /k, a artéria pulmonar direita foi champeada e, após 10 minutos, os parâmetros de controle foram analisados, com o intuito de observar a performance do pulmão esquerdo antes de sua remoção e posterior reimplante. A seguir, após a liberação da AP direita, o pulmão esquerdo foi removido após pinçamento da AP, brônquio e átrio esquerdo, incluindo-se as respectivas veias pulmonares e o pulmão removido com parte da parede atrial esquerda.

Em um recipiente com solução eletrolítica gelada, a artéria pulmonar foi perfundida com 1000 ml de solução de Collins modificada a 4°C, enquanto o pulmão era insuflado manualmente durante o período em que era perfundido. Após esse procedimento e submerso em solução eletrolítica a 4°C, o pulmão foi deixado em refrigeração nessa temperatura durante 4 horas. Após esse período, o pulmão foi re-implantado, anastomosando-se o átrio esquerdo com Prolene 5-0 e sutura contínua. O brônquio foi anastomosado com prolene 4-0 e, a seguir, a artéria pulmonar com Prolene 6-0. após terem

sido permitidos 15 minutos de ventilação e reperfusão com o pulmão reimplantado, a artéria pulmonar direita foi ligada, a fim de manter o animal dependente do pulmão reimplantado. Após a monitorização por seis horas, o animal foi sacrificado, o pulmão esquerdo removido, pesado, e material retirado para avaliação anatomopatológica.

No segundo grupo de animais (n = 6 desferoxamina), o mesmo procedimento foi realizado, porém no período de uma hora e 30 minutos anteriormente à reperfusão pulmonar, 500 mg de desferoxamina foram diluídos em 250 ml de Ringer lactado e administrados E.V. durante período de duas horas.

Pressões, DC, gases arteriais e eletrólitos foram analisados após o animal ter sido anestesiado, após o pinçamento da artéria pulmonar direita, após a remoção do pulmão esquerdo e nos intervalos de 20, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após o reimplante do pulmão esquerdo e subsequente ligadura da artéria pulmonar direita.

O peso do pulmão reimplantado foi medido após a sua remoção e colocação em estufa a 45°C por três dias e o volume de retenção de líquidos durante o experimento foi estimado. A resistência vascular pulmonar foi calculada usando-se os valores de DC, pressão média de artéria pulmonar e pressão de átrio esquerdo.

Todos os dados foram analisados através de teste T de Student, comparando a média dos grupos para significância das diferenças através dos valores de P. Valores de P > 0,05 foram considerados sem diferença estatística.

RESULTADOS

Todos os dados coletados e a média dos grupos foram analisados estatisticamente para obter-se a significância das diferenças. A análise do sangue arterial durante as seis horas após o reimplante demonstrou melhor oxigenação do grupo tratado com desferoxamina, com significativa diferença nos primeiros 20 minutos após o reimplante (P < 0,05) 30 minutos (P < 0,02) e 60 minutos (P < 0,05) (Figura 1). Embora sem diferença estatística, a oxigenação permanece superior nos outros intervalos. O gradiente arterial/alveolar também demonstrou alterações semelhantes com gradientes inferiores no grupo tratado com desferoxamina e valores de P significativos nos intervalos de 20 minutos (P < 0,01), 30 minutos (P < 0,02) e 60 minutos (P < 0,05) que sucederam à reperfusão (Figura 2). O peso pulmonar seco também foi inferior no grupo tratado; porém, sem significância estatística (.10 < p < .20) (Figura 3). A histopatologia de duas diferentes áreas em cada pulmão transplantado demonstrou graus variáveis de edema alveolar, edema intersticial, pneumonite ou pleurite em ambos os grupos; porém, estas alterações nunca foram significativas. Todos os outros dados: resistência arterial

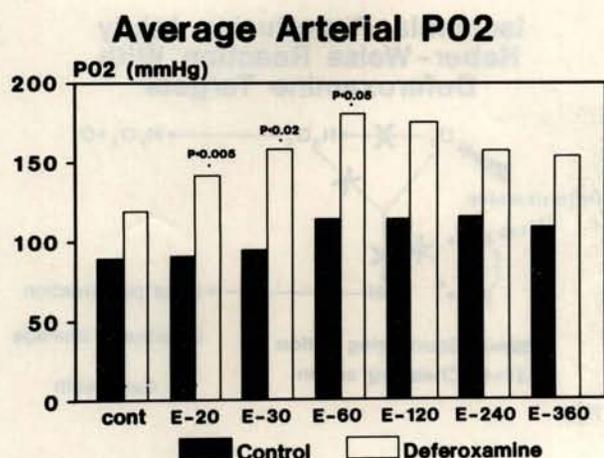


Fig. 1

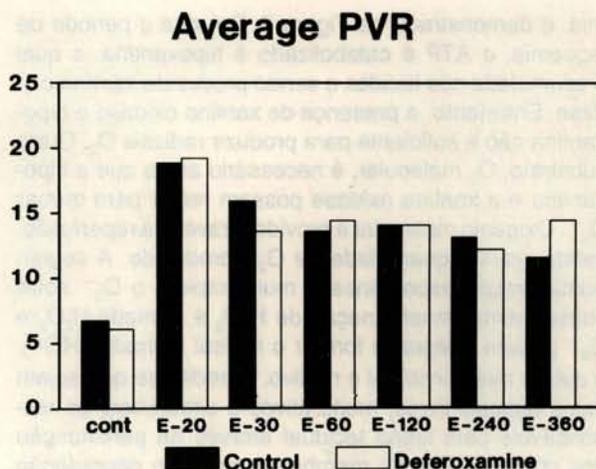


Fig. 4

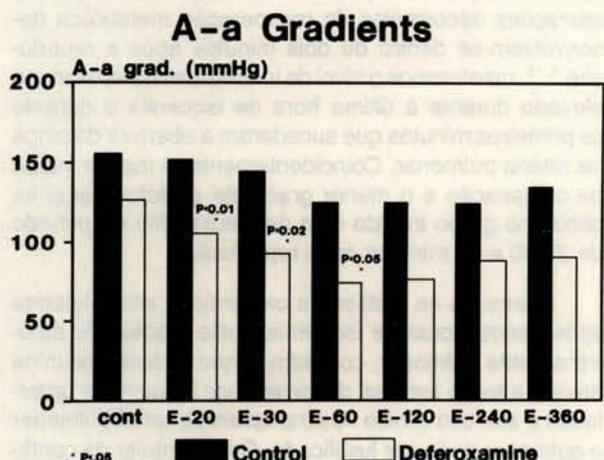


Fig. 2

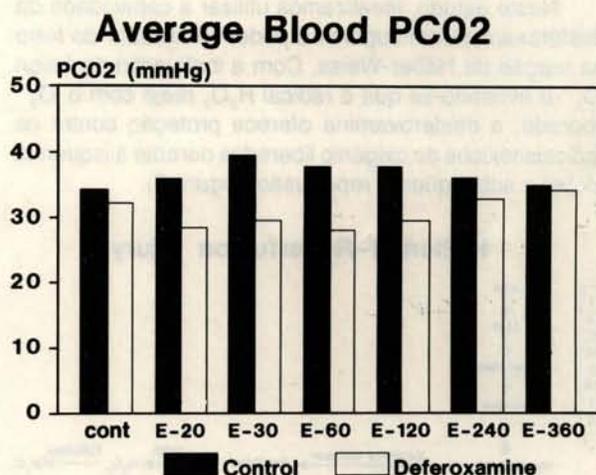


Fig. 5

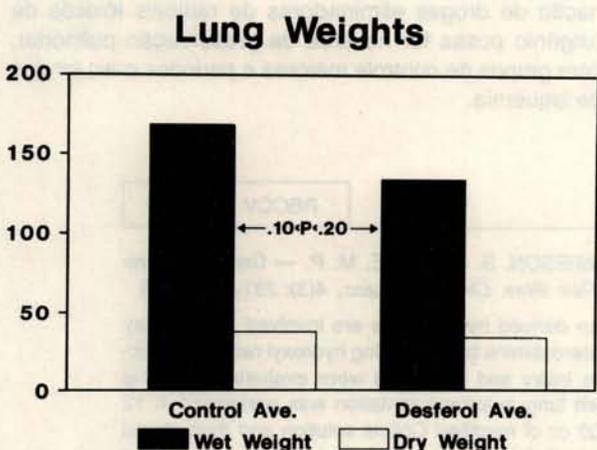


Fig. 3

pulmonar (PVR, Figura 4), pCO_2 (Figura 5), eletrólitos e DC mantiveram-se semelhantes nos dois grupos estudados.

O progresso técnico alcançado com o transplante cardiopulmonar e pulmonar tem estimulado a investi-

gação de formas mais satisfatórias de proteção do parênquima pulmonar à lesão isquêmica e de reperfusão.

Apesar dos métodos de preservação miocárdica estarem, hoje, bem estabelecidos, permitindo clinicamente ótima função miocárdica após períodos de quatro horas e meia de isquemia, o tecido pulmonar, devido às suas características fisiológicas, ainda é mais suscetível a esses procedimentos. O leito capilar e os septos alveolares são mais sensíveis à lesão isquêmica, resultando em edema, rotura da membrana alvéolo-capilar e subsequente deterioração funcional¹¹. Vários métodos de preservação tecidual contra a isquemia, bem como a adição de drogas (SOD, DMSO, catalase, alopurinol) que possam auxiliar na prevenção da formação de radicais HO^* tóxicos ao tecido celular têm sido investigados^{2, 6, 13, 16, 19, 20}. Apesar de a desferoxamina já ter sido investigada na prevenção da lesão de reperfusão no miocárdio, seus benefícios foram, aqui, pela primeira vez experimentalmente evidenciados na preservação do tecido pulmonar.

O esquema proposto por GRANGER *et alii*¹⁰, explicando o mecanismo de formação do radical O_2 pós isque-

ma, é demonstrado na Figura 6. Durante o período de isquemia, o ATP é catabolizado à hipoxantina, a qual é acumulada nos tecidos e sendo produzida xantina oxidase. Entretanto, a presença de xantina oxidase e hipoxantina não é suficiente para produzir radicais O_2^- . Outro substrato, O_2 molecular, é necessário antes que a hipoxantina e a xantina oxidase possam reagir para formar O_2^- . Oxigênio molecular é provido através da reperfusão, sendo grande quantidade de O_2^- produzido. A seguir, numa reação espontânea e muito rápida, o O_2^- sofre subsequente transformação de H_2O_2 é formado. H_2O_2 e O_2^- podem integrar e formar o radical hidroxila (HO^*), o qual é muito instável e reativo. Acredita-se que sejam estes radicais livres, muito ativos e citotóxicos, os responsáveis pela lesão tecidual através da peroxidação dos componentes da membrana celular e degradação do ácido hialurônico e do colágeno⁸.

Neste estudo, idealizamos utilizar a capacidade da desferoxamina em suprimir o poder catalizador do ferro na reação de Haber-Weiss. Com a inativação do ânion O_2^- e evitando-se que o radical H_2O_2 reaja com o O_2^- liberado, a desferoxamina oferece proteção contra os radicais tóxicos de oxigênio liberados durante a isquemia global e subsequente reperfusão (Figura 7).

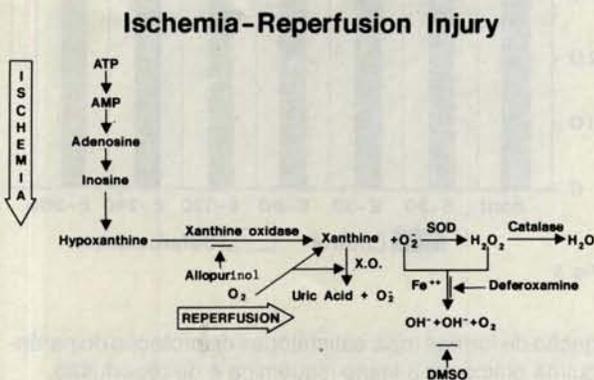


Fig. 6

Ischemia-Reperfusion Injury Haber-Weiss Reaction With Desferoxamine Targets

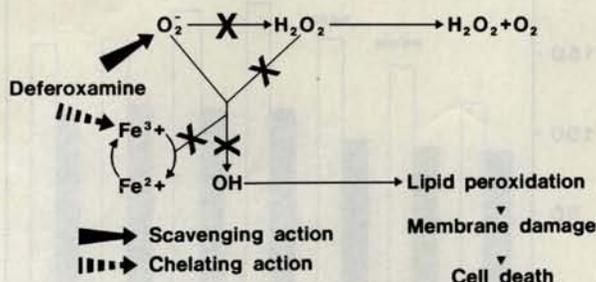


Fig. 7

Com a suposição de que a concentração de radicais livres de O_2 é alcançada em 30 segundos e que as alterações decorrentes da recuperação metabólica desenvolvem-se dentro de dois minutos após a reperfusão^{3, 15}, mantivemos o nível de infusão de desferoxamina elevado durante a última hora de isquemia e durante os primeiros minutos que sucederam a abertura da pinça da artéria pulmonar. Coincidentemente, o melhor índice de oxigenação e o menor gradiente alvéolo-arterial foi obtido no grupo tratado com desferoxamina no período de 20-30 e 60 minutos após reperfusão.

Baseados na análise da oxigenação arterial obtida após quatro horas de isquemia neste modelo de auto-transplante pulmonar, concluímos que a desferoxamina atenua a lesão tecidual decorrente de isquemia e reperfusão e seu uso clínico nos transplantes cardiopulmonar e pulmonar pode ser justificado. Com o intuito de confirmarmos esses promissores resultados iniciais, presente-mente continuamos investigando os efeitos que a combinação de drogas eliminadoras de radicais tóxicos de oxigênio possa ter na área da preservação pulmonar, com grupos de controle maiores e períodos mais longos de isquemia.

RBCCV 44205-99

FRAGOMENI, L. S.; BONSER, R. S.; EDWARDS, B.; JAMIESON, S. W.; KAYE, M. P. — Desferoxamine and its protective effect in pulmonary preservation. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, 4(3): 237-241, 1989.

ABSTRACT: There is increasing evidence that oxygen derived free radicals are involved in the injury that occurs following the reperfusion of ischaemic tissue. Desferoxamine by preventing hydroxyl radical production and scavenging superoxide anion may attenuate this injury and its effects were evaluated following 4 hours of static hypothermic pulmonary preservation. Left lung autotransplantation was performed in 12 mongrel dogs. The autograft was initially flushed with 1000 cc of modified Collins solution and then stored in an inflated state for 4 hours in 4°C saline. Six dogs received desferoxamine 500 mg intravenously infused before and immediately after the time of reperfusion. Following reimplantation, contralateral pulmonary artery ligation was performed and the animals were then maintained on a fixed FiO_2 (40%) and monitored for 6 hours. During the first hour of reperfusion arterial pO_2 was significantly better in the desferoxamine treated dogs ($p < 0.05$). Alveolar-arterial oxygen gradients were also lower ($p < 0.05$). Pulmonary vascular resistance was not different between groups. We conclude that desferoxamine improves gas exchange in the immediate reperfusion period and that further investigation of its use is warranted.

DESCRIPTORS: pulmonary preservation, desferoxamine; free radicals.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AMBROSIO, G.; WEISFELDT, M. L.; JACOBUS, W. E.; FLAHERTY, J. T. — Evidence for a reversible, oxygen radical mediated component of reperfusion damage: reduction by recombinant human superoxide dismutase administered at the time of reflow. *Circulation*, 75: 282-291, 1987.
- 2 AMBROSIO, G.; ZWEIER, J. L.; JACOBUS, W. E.; WEISFELDT, M. L.; FLAHERTY, J. T. — Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation*, 76: 906-915, 1987.
- 3 AMBROSIO, G.; ZWEIER, J. L.; WEISFELDT, M. L.; FLAHERTY, J. T. — Early toxic effects of oxygen free radicals on myocardial energy metabolism following reperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 9: 125A, 1987.
- 4 AUST, S. D.; MOREHOUSE, L. A.; THOMAS, C. E. — Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Radicals Biol. Med.*, 1: 3-25, 1985.
- 5 AUST, S. D. & WHITE, B. C. — Iron chelation prevents tissue injury following ischemia. *Adv. Free Radicals Biol.*, 1: 1-17, 1985.
- 6 BANDO, K.; TAGO, M.; TERAMOTO, S. — Prevention of free radical-induced myocardial injury by allopurinol. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 95: 465-473, 1988.
- 7 CASALE, A. A.; BUKLEY, G. B.; BULKLEY, B. H.; FLAHERTY, J. T.; GOTT, V. L.; GARDNER, T. J. — Oxygen free-radical scavengers protect the arrested, globally ischemic heart upon reperfusion. *Surg. Forum*, 34: 313-316, 1983.
- 8 FRIDOVICH, I. — The biology of oxygen radicals. *Science*, 210: 875-880, 1978.
- 9 GRAF, E.; MAHONEY, J. R.; BRYANT, R. G.; EATON, J. W. — Iron-catalyzed hydroxyl radical formation: stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.*, 259: 3620-3624, 1987.
- 10 GRANGER, D. N.; HOLLWARTH, M. A.; PARKS, D. A. — Ischemia reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol. Scand.*, 126 (Supl. 1): 47-63, 1986.
- 11 HAVERICH, A.; SCOTT, W. C.; JAMIESON, S. W. — Twenty years of lung preservation: a review. *Heart Transplant.*, 4: 234-240, 1985.
- 12 HESS, M. L. & MANSON, N. H. — Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 16: 969-985, 1984.
- 13 JURMANN, M. J.; SCHAEFERS, H. J.; DAMMENHAYN, L.; HAVERICH, A. — Oxygen-derived free radical scavengers for amelioration of reperfusion damage in heart transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 95: 368-377, 1988.
- 14 McCORD, J. M. — Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*, 312: 159-163, 1985.
- 15 McCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. — Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.*, 244: 6049-6065, 1969.
- 16 MENASCHE, P.; GROUSSET, C.; GAUDUEL, Y.; MOVAS, C.; PIWNICA, A. — Prevention of hydroxyl radical formation. A critical concept for improving cardioplegia: protective effects of deferoxamine. *Circulation*, 76 (Supl. 5): 180-185, 1988.
- 17 MYERS, C. L.; WEISS, S. J.; KIRSH, M. M.; SHLAFER, M. — Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in the "oxygen paradox" reduction of creatine kinase release by catalase, allopurinol or deferoxamine but not by superoxide dismutase. *J. Moll. Cell Cardiol.*, 17: 675-684, 1985.
- 18 SHLAFER, M.; KANE, P. F.; WIGGINS, V. Y.; KIRSH, M. M. — Possible role for cytotoxic oxygen metabolites in the pathogenesis of cardiac ischemic injury. *Circulation*, 66 (Supl. 1): 85-92, 1982.
- 19 SIMPSON, P.; MICKELSON, J. K.; LUCCHESI, B. R. — Free radical scavengers in myocardial ischemia. *Fed. Proc.*, 46: 2413-2421, 1987.

AGRADECIMENTO: Este trabalho não poderia ter sido completado sem o inestimável auxílio dos Técnicos em Laboratório Edward Van Bergen e Sally Brown.