



Efeitos da N-acetilcisteína e pentoxifilina na lesão pulmonar remota em um modelo de lesão de isquemia/reperfusão de membro posterior em ratos

Hamed Ashrafzadeh Takhtfooladi¹, Saeed Hesaraki¹, Foad Razmara²,
Mohammad Ashrafzadeh Takhtfooladi³, Hadi Hajizadeh⁴

1. Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Doctor of Veterinary Medicine, Novin Pet Clinic, Isfahan, Iran.
3. Young Researchers and Elites Club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Department of Clinical Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Recebido: 29 julho 2015.

Aprovado: 4 novembro 2015.

Trabalho realizado no Young Researchers and Elites Club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Teerã, Irã.

RESUMO

Objetivo: Investigar os efeitos da N-acetilcisteína (NAC) e pentoxifilina em um modelo de lesão pulmonar remota após isquemia/reperfusão (I/R) de membro posterior em ratos. **Métodos:** Trinta e cinco ratos Wistar machos foram divididos em cinco grupos (n = 7/grupo), cada qual submetido ao seguinte: operação simulada (grupo controle); isquemia de membro posterior, induzida por pinçamento da artéria femoral esquerda por 2 h, seguida por 24 h de reperfusão (grupo I/R); e isquemia de membro posterior, como descrito acima, seguida de injeção intraperitoneal (antes da reperfusão) de 150 mg/kg de NAC (grupo I/R+NAC), 40 mg/kg de pentoxifilina (grupo I/R+PTX) ou ambas (grupo I/R+NAC+PTX). Ao final do experimento, tecidos pulmonares foram removidos para análise histológica e avaliação do estresse oxidativo. **Resultados:** Comparados aos ratos dos outros grupos, os do grupo I/R apresentaram menor atividade de superóxido dismutase e menores níveis de glutatona, além de maiores níveis de malondialdeído e maiores escores de lesão pulmonar (p < 0,05 para todos). Infiltração celular inflamatória intersticial dos pulmões também foi bem maior no grupo I/R do que nos outros grupos. Além disso, os ratos do grupo I/R apresentaram vários sinais de edema intersticial e hemorragia. Nos grupos I/R+NAC, I/R+PTX e I/R+NAC+PTX, a atividade de superóxido dismutase, níveis de glutatona, níveis de malondialdeído e escores de lesão pulmonar foram preservados (p < 0,05 para todos). As diferenças entre a administração de NAC ou pentoxifilina isoladamente e a das duas combinadas não foi significativa para nenhum desses parâmetros (p > 0,05 para todos). **Conclusões:** Nossos resultados sugerem que tanto NAC quanto pentoxifilina protegem o tecido pulmonar dos efeitos de I/R de músculo esquelético. Entretanto, seu uso combinado não parece aumentar o nível dessa proteção.

Descritores: Músculo esquelético; Isquemia; Traumatismo por reperfusão; Lesão pulmonar; Acetilcisteína; Pentoxifilina.

INTRODUÇÃO

O restabelecimento da perfusão em um tecido após um período de isquemia piora a lesão isquêmica inicial. Esse processo é denominado lesão de isquemia/reperfusão (I/R).⁽¹⁾ Esse tipo de lesão é um evento clínico importante e é comum nas extremidades inferiores. Embora a restauração do fluxo sanguíneo possa salvar a extremidade, pode também resultar em síndrome de disfunção de múltiplos órgãos.⁽²⁾ Por exemplo, a I/R de um membro inferior resulta em edema pulmonar não cardiogênico por meio de vasoconstricção pulmonar, hipertensão pulmonar e aumento da permeabilidade da membrana alveolar.⁽³⁾ A disfunção pulmonar após a lesão de I/R de uma extremidade inferior continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade.⁽⁴⁾ Estudos anteriores sugeriram que radicais livres de oxigênio, mediadores inflamatórios e, em especial, neutrófilos desempenham um papel importante na lesão pulmonar relacionada com I/R em um membro inferior.^(5,6)

Diversos agentes reduzem a lesão pulmonar remota após a I/R dos membros posteriores de ratos.⁽⁷⁻⁹⁾ A N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante que aumenta os níveis intracelulares de glutatona e realiza a eliminação direta de espécies reativas de oxigênio (ERO) como ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio, superóxido e radical hidroxila.⁽¹⁰⁾ Demonstrou-se que a pentoxifilina, um inibidor não específico da fosfodiesterase, melhora a oxigenação tecidual e a função endotelial, além de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias.⁽¹¹⁾ A pentoxifilina inibe também a proliferação celular e a acumulação de matriz extracelular.⁽¹²⁾ Portanto, no presente estudo, avaliou-se, por meio da análise dos efeitos da pentoxifilina, da NAC e da combinação de ambas, o possível envolvimento do estresse oxidativo na lesão pulmonar induzida por I/R de músculo esquelético em ratos.

MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com diretrizes estabelecidas de tratamento ético

Endereço para correspondência:

Mohammad Ashrafzadeh Takhtfooladi. Young Researchers and Elites Club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Tel.: 00989132004875. Fax: 00983117860211. Email: dr_ashrafzadeh@yahoo.com
Apoio financeiro: Nenhum.

de animais experimentais, e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Tratamento e Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Azad Islâmica, na cidade de Teerã, no Irã.

Trinta e cinco ratos Wistar machos adultos saudáveis com 90-120 dias de idade e 250-350 g de peso foram comprados do Instituto Pasteur do Irã. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura e umidade controladas ($22 \pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa: $50 \pm 5\%$), em ciclo claro-escuro de 12 h, com ração comercial em forma de pellet e água de torneira filtrada à vontade. Os animais foram aleatoriamente divididos em cinco grupos experimentais de sete ratos cada: grupo I/R, no qual os animais foram submetidos a 2 h de isquemia de membro posterior, induzida por meio de pinçamento da artéria femoral esquerda, seguida de administração, por via intraperitoneal, de 2 ml de solução salina a 0,9% e 24 h de reperfusão; grupo operação simulada (controle), no qual os animais foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos exceto oclusão arterial e receberam solução salina a 0,9% (2 ml, i.p.); grupo I/R+NAC, no qual os animais foram submetidos a I/R conforme descrito acima e receberam 150 mg/kg de NAC em solução salina a 0,9% (i.p., em um volume total de 2 ml); grupo I/R+PTX, no qual os animais foram submetidos a I/R conforme descrito acima e receberam 40 mg/kg de pentoxifilina em solução salina a 0,9% (i.p., em um volume total de 2 ml); grupo I/R+NAC+PTX, no qual os animais foram submetidos a I/R conforme descrito acima e receberam tanto NAC como pentoxifilina (nas doses indicadas acima) em solução salina a 0,9% (i.p., em um volume total de 2 ml).

Os ratos foram pesados e depois anestesiados com cloridrato de cetamina a 10% e cloridrato de xilazina a 2% (i.m., 50 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). Os animais foram colocados sobre uma almofada de aquecimento, em decúbito dorsal, com o tórax e os membros posteriores imobilizados com fita adesiva. Após a preparação cirúrgica asséptica, 250 UI de heparina foram administradas pela veia jugular (a fim de evitar coagulação) e uma incisão cutânea foi feita na face medial do membro posterior esquerdo. Após o isolamento da artéria femoral esquerda dos tecidos circundantes, a isquemia foi induzida por meio de uma pinça microvascular para ocluir a artéria durante 2 h. Durante todo o período de isquemia, os animais foram mantidos em decúbito dorsal e permaneceram anestesiados (doses adicionais administradas conforme necessário). A temperatura corporal foi monitorada por meio de um termômetro retal. No fim do período de isquemia, a pinça foi removida e o sítio cirúrgico foi suturado de modo rotineiro com fio de polipropileno 4/0. Os animais do grupo controle foram submetidos a um procedimento cirúrgico semelhante, porém sem oclusão arterial. Os ratos submetidos a isquemia foram em seguida submetidos a 24 h de reperfusão. Ao longo dos períodos de isquemia e reperfusão, os animais receberam suporte ventilatório não invasivo.

No fim do período experimental, todos os ratos foram sacrificados por meio de uma overdose de pentobarbital (300 mg/kg, i.p.) e os pulmões foram removidos em bloco. Os pulmões esquerdos foram imersos em solução de formalina a 10%, e os pulmões direitos foram armazenados a -20°C para análise bioquímica subsequente. As amostras de tecido pulmonar homogeneizado e sobrenadante foram preparadas conforme descrito por Yildirim et al.⁽¹³⁾ Os níveis de malondialdeído, a atividade de superóxido dismutase (SOD) e os níveis de glutatona foram medidos nos pulmões direitos, ao passo que amostras dos pulmões esquerdos foram submetidas a avaliação histopatológica por meio de microscopia de luz.

Os níveis de malondialdeído foram determinados por meio da reação ao ácido tiobarbitúrico, conforme descreveu Yagi.⁽¹⁴⁾ No teste de reação ao ácido tiobarbitúrico, o malondialdeído (ou substâncias semelhantes) reage(m) com o ácido tiobarbitúrico e produz(em) um cromógeno rosa com pico de absorvância a 532 nm no espectrofotômetro. Os níveis teciduais de malondialdeído são expressos em nmol/g de tecido.

A atividade de SOD foi determinada de acordo com o método elaborado por Winterbourn et al.,⁽¹⁵⁾ pela inibição da redução fotoquímica do azul de nitrotetrazólio a 560 nm. A atividade de SOD é expressa em U/g de tecido.

Os níveis de glutatona foram determinados pelo método descrito por Ellman,⁽¹⁶⁾ segundo o qual o nível de glutatona é considerado diretamente proporcional à taxa de formação do cromógeno reduzido, ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), que se determina por meio da medição de sua absorvância a 412 nm. Os resultados são expressos em nmol/g de tecido.

Os espécimes de pulmão esquerdo foram fixados em formalina tamponada a 10%, processados por meio de técnicas convencionais e incluídos em parafina. Foram feitos cortes transversais de 5 μm de espessura nas zonas médias dos pulmões, e as seções foram montadas em lâminas. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e, em seguida, examinadas por meio de microscopia de luz por um patologista que desconhecia os grupos. A lesão pulmonar foi avaliada semiquantitativamente por meio da classificação de Koxsel et al.⁽¹⁷⁾: grau 0, aparência normal; grau 1, congestão intersticial e infiltração de neutrófilos de leve a moderada; grau 2, edema perivascular, destruição parcial da arquitetura pulmonar e moderada infiltração de neutrófilos; grau 3, destruição completa da arquitetura pulmonar e densa infiltração de neutrófilos. Cinco lâminas de cada amostra de pulmão foram avaliadas aleatoriamente, e a média foi aceita como o valor representativo da amostra.

Todos os resultados são apresentados em forma de média \pm desvio padrão. Os resultados analíticos foram avaliados por meio do programa *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Como se pode observar na Figura 1, os níveis de malondialdeído foram significativamente maiores no grupo I/R do que em qualquer um dos demais grupos ($p < 0,05$). Além disso, os níveis de malondialdeído foram menores no grupo I/R+NAC+PTX do que nos grupos I/R+NAC e I/R+PTX, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas. A atividade de SOD foi significativamente menor no grupo I/R do que no grupo controle (Figura 2) e significativamente maior nos grupos I/R+NAC, I/R+PTX e I/R+NAC+PTX do que no grupo I/R ($p < 0,05$). Embora a maior atividade de SOD tenha sido observada no grupo I/R+NAC+PTX, não houve diferenças significativas entre os grupos I/R+PTX, I/R+NAC e I/R+NAC+PTX quanto à atividade de SOD. Os níveis de glutatona também foram significativamente menores no grupo I/R do que no grupo controle (Figura 3) e significativamente maiores nos grupos I/R+NAC, I/R+PTX e I/R+NAC+PTX do que no grupo I/R. Embora os níveis de glutatona tenham sido maiores no grupo I/R+NAC+PTX do que nos grupos I/R+NAC e I/R+PTX, as diferenças entre esses três grupos não foram significativas. As médias

da pontuação relativa à histopatologia pulmonar são apresentadas, por grupo, na Figura 4. A média da pontuação do grupo I/R foi significativamente menor do que a média da pontuação dos grupos I/R+NAC, I/R+PTX e I/R+NAC+PTX, embora não tenha havido diferenças significativas entre os três grupos tratados quanto à pontuação relativa à lesão pulmonar. Como se pode observar na Figura 5, a infiltração celular inflamatória intersticial foi muito mais pronunciada nas amostras de pulmão dos ratos do grupo I/R do que nas dos ratos dos demais grupos. Os pulmões dos ratos do grupo I/R apresentaram também vários sinais de edema intersticial e hemorragia.

DISCUSSÃO

O pinçamento das artérias periféricas é rotineiramente usado em casos de cirurgia ortopédica ou trauma ortopédico, em procedimentos eletivos e de emergência. Demonstrou-se que a oclusão arterial transitória pode danificar os pulmões. O dano isquêmico resulta de uma diminuição do fluxo sanguíneo em um órgão. Quando o fluxo sanguíneo é restaurado, ocorre um dano maior, denominado lesão de reperfusão. Sugeriu-se que o

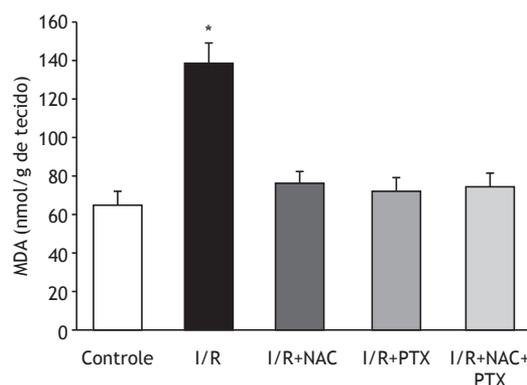


Figura 1. Níveis de malondialdeído (MDA) no tecido pulmonar após 2 h de isquemia de membro posterior e 24 h de reperfusão. I/R: isquemia/reperfusão; NAC: N-acetilcisteína; e PTX: pentoxifilina. * $p < 0,05$ vs. todos os demais grupos.

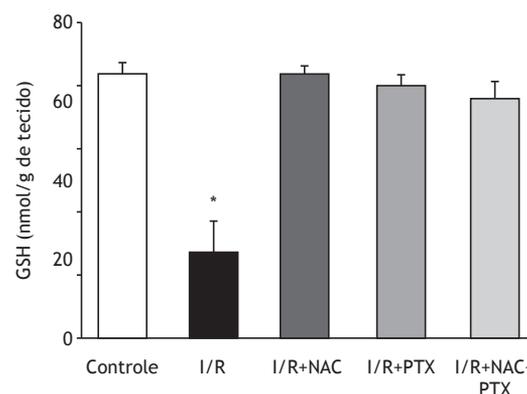


Figura 3. Níveis de glutatona (GSH) no tecido pulmonar após 2 h de isquemia de membro posterior e 24 h de reperfusão. I/R: isquemia/reperfusão; NAC: N-acetilcisteína; e PTX: pentoxifilina. * $p < 0,05$ vs. todos os demais grupos.

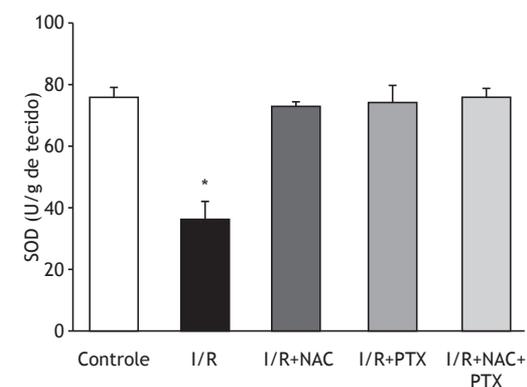


Figura 2. Atividade de superóxido dismutase (SOD) no tecido pulmonar após 2 h de isquemia de membro posterior e 24 h de reperfusão. I/R: isquemia/reperfusão; NAC: N-acetilcisteína; e PTX: pentoxifilina. * $p < 0,05$ vs. todos os demais grupos.

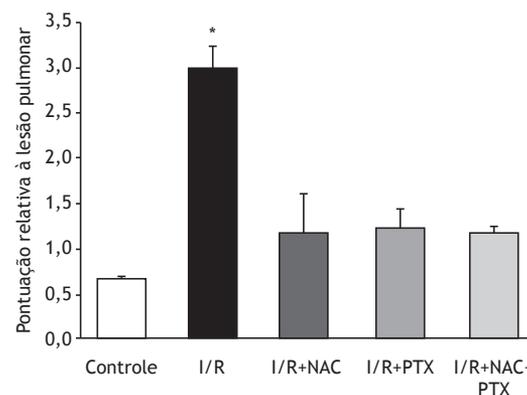


Figura 4. Pontuação relativa à histologia da lesão pulmonar após 2 h de isquemia de membro posterior e 24 h de reperfusão. I/R: isquemia/reperfusão; NAC: N-acetilcisteína; e PTX: pentoxifilina. * $p < 0,05$ vs. todos os demais grupos.

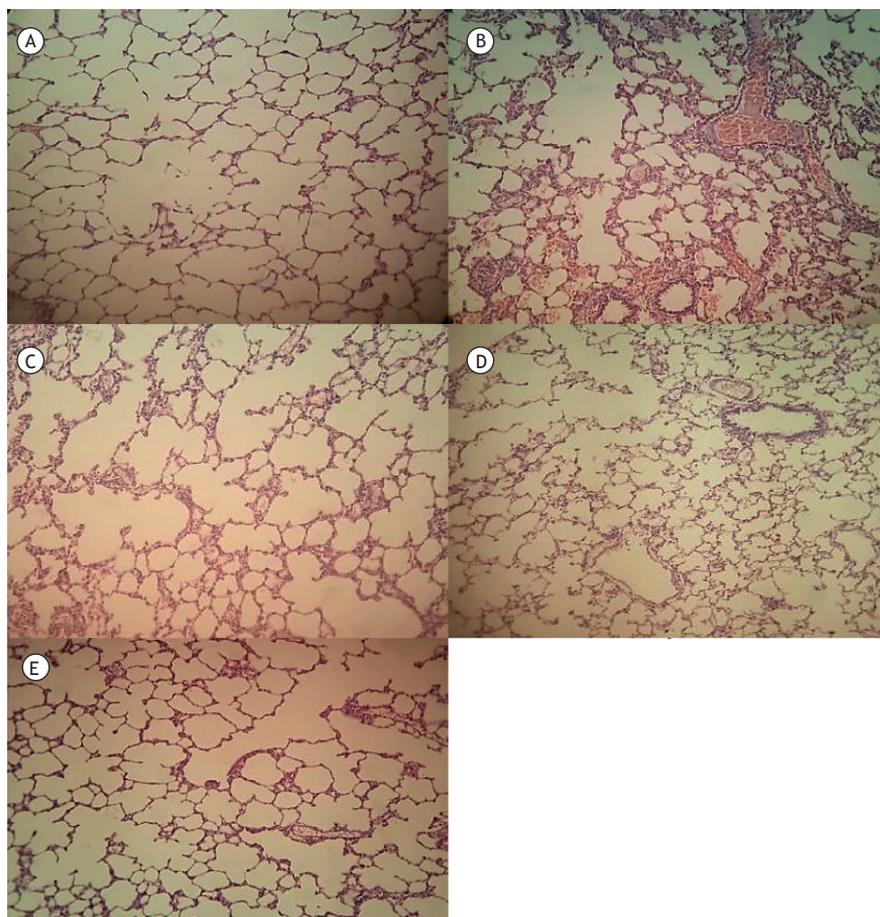


Figura 5. Amostras de tecido pulmonar coradas com hematoxilina e eosina (aumento original: 100×): (A) amostra do grupo controle, sem alterações patológicas dignas de nota; (B) amostra do grupo isquemia/reperfusão (I/R), com alterações histológicas generalizadas, tais como edema, congestão alveolar grave, colapso alveolar e infiltração de células inflamatórias; (C, D e E, respectivamente) amostras dos grupos I/R+N-acetilcisteína, I/R+pentoxifilina e I/R+N-acetilcisteína+pentoxifilina, todas elas com menos alterações histológicas (evidentemente menos edema intersticial e infiltração de células inflamatórias) do que a amostra do grupo I/R.

estresse oxidativo desempenha um papel na lesão de I/R.⁽¹⁸⁾ Diversos marcadores teciduais de estresse oxidativo foram medidos a fim de avaliar os efeitos da lesão de I/R. Sabe-se que as ERO, que são potentes agentes oxidantes e redutores que podem danificar diretamente as membranas celulares por meio de peroxidação lipídica, são produzidas em excesso durante o estresse oxidativo.⁽¹⁹⁾ A peroxidação de lipídios endógenos leva à conversão de glutatona reduzida em dissulfeto de glutatona.⁽²⁰⁾ O malondialdeído é um produto final derivado da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados e ésteres afins. Portanto, os níveis teciduais de malondialdeído são um reflexo válido da peroxidação lipídica. Outra linha de defesa celular contra radicais livres é um sistema de três enzimas: SOD, catalase e glutatona peroxidase. A SOD catalisa a conversão de superóxidos em peróxido de hidrogênio, que é subsequentemente convertido em água e oxigênio pela catalase ou glutatona peroxidase. Como a SOD desempenha um papel tão importante na defesa celular contra os radicais livres, é também um importante indicador do estado oxidativo.⁽²¹⁾

A NAC é um precursor da glutatona; é uma molécula pequena que contém um grupo tiol, que possui propriedades antioxidantes, e é livremente filtrável com pronto acesso aos compartimentos intracelulares.⁽²²⁾ A diversidade de aplicações farmacológicas da NAC deve-se principalmente às propriedades químicas do grupo tiol cisteínico de sua molécula; a capacidade de grupos tiol reduzidos de eliminar radicais livres de oxigênio já está bem estabelecida.⁽²³⁻²⁵⁾ Além disso, a NAC tem uma variedade de efeitos anti-inflamatórios.^(26,27) Estudos anteriores com ratos demonstraram que a administração de NAC em doses de aproximadamente 400 mg/kg protege os órgãos de danos oxidativos.^(28,29) No presente estudo, verificou-se que, em comparação com a ausência de tratamento, a administração de NAC após a isquemia (antes da reperfusão) resultou em menores níveis de malondialdeído, maior atividade de SOD e maiores níveis de glutatona. Em outras palavras, a NAC atenuou de maneira eficaz o aumento do nível de malondialdeído induzido por I/R.

A pentoxifilina é um derivado da metilxantina com várias propriedades hemorreológicas. A pentoxifilina

umenta o monofosfato cíclico de adenosina intracelular nas hemácias e, assim, melhora a oxigenação dos tecidos isquêmicos, aumenta o monofosfato cíclico de adenosina nos leucócitos polimorfonucleares e diminui a produção de radicais livres de oxigênio.⁽³⁰⁻³³⁾ Relatos recentes sugerem que a pentoxifilina é capaz de aumentar a resposta quimiotática dos neutrófilos e inibir a fagocitose e a produção de superóxidos por neutrófilos e monócitos.⁽³⁴⁾ Esses achados traduziram-se em benefícios clínicos: a pentoxifilina já foi usada para atenuar a lesão de I/R em pacientes com dano pulmonar, intestinal ou renal.⁽³¹⁾ Estudos anteriores demonstraram que a administração de 50 mg/kg de pentoxifilina tem o efeito benéfico de reduzir o estresse oxidativo e índices inflamatórios em casos de lesão da medula espinhal induzida por I/R e doença hepática gordurosa.^(35,36) No presente estudo, a administração de pentoxifilina após a isquemia (antes da reperfusão) resultou em menores níveis de malondialdeído, maior atividade de SOD e maiores níveis de glutatona em comparação com a ausência de tratamento.

Em suma, o significativo aumento dos níveis de malondialdeído, a significativa redução dos níveis de glutatona e a aparência destrutiva na histologia pulmonar após I/R sugerem que a lesão pulmonar induzida por I/R de músculo esquelético é mediada por reações de oxidação. Os resultados de nosso estudo confirmam que tanto a pentoxifilina como a NAC oferecem proteção contra a lesão de I/R. Esses efeitos podem ser atribuídos, pelo menos parcialmente, à inibição da produção de ERO. Até onde sabemos, este foi o primeiro estudo a comparar os efeitos dessas duas substâncias na lesão pulmonar remota. As propriedades antioxidantes da pentoxifilina mostraram-se comparáveis às da NAC. No entanto, não se observou nenhum efeito adicional quando ambas foram administradas juntas. Mais estudos são necessários para determinar a importância clínica do tratamento com pentoxifilina e NAC, especialmente no que tange aos possíveis mecanismos além da eliminação de ERO. Tais tratamentos podem se mostrar eficazes em reforçar a proteção dos pulmões após a I/R dos membros inferiores.

REFERÊNCIAS

- Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282(2):C227-41. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00112.2001>
- Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg.* 2002;26(1):115-21. <http://dx.doi.org/10.1007/s00268-001-0169-2>
- Groeneveld AB, Raijmakers PG, Rauwerda JA, Hack CE. The inflammatory response to vascular surgery-associated ischaemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997;14(5):351-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S1078-5884\(97\)80284-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1078-5884(97)80284-5)
- Paterson IS, Klausner JM, Pugatch R, Allen P, Mannick JA, Shepro D, et al. Noncardiogenic pulmonary edema after abdominal aortic aneurysm surgery. *Ann Surg.* 1989;209(2):231-6. <http://dx.doi.org/10.1097/0000658-198902000-00015>
- Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg.* 1991;78(6):651-5. <http://dx.doi.org/10.1002/bjs.1800780607>
- Fantini GA, Conte MS. Pulmonary failure following lower torso ischemia: clinical evidence for a remote effect of reperfusion injury. *Am Surg.* 1995;61(4):316-9.
- Taktfooladi H, Taktfooladi M, Moayeri F, Mobarakeh S. Melatonin attenuates lung injury in a hind limb ischemia-reperfusion rat model. *Rev Port Pneumol (2006).* 2015;21(1):30-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rppnen.2014.01.010>
- Taktfooladi MA, Jahanshahi A, Sotoudeh A, Jahanshahi G, Taktfooladi HA, Aslani K. Effect of tramadol on lung injury induced by skeletal muscle ischemia-reperfusion: an experimental study. *J Bras Pneumol.* 2013;39(4):434-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132013000400006>
- Sotoudeh A, Taktfooladi MA, Jahanshahi A, Asl AH, Taktfooladi HA, Khansari M. Effect of N-acetylcysteine on lung injury induced by skeletal muscle ischemia-reperfusion. *Histopathological study in rat model.* *Acta Cir Bras.* 2012;27(2):168-71. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502012000200012>
- Nitescu N, Ricksten SE, Marcussen N, Haraldsson B, Nilsson U, Basu S, et al. N-acetylcysteine attenuates kidney injury in rats subjected to renal ischaemia reperfusion. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(5):1240-7. <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfk032>
- Okumura AS, Rodrigues LE, Martinelli R. Pentoxifylline in ischemia-induced acute kidney injury in rats. *Ren Fail.* 2009;31(9):829-32. <http://dx.doi.org/10.3109/08860220903137509>
- Lin SL, Chen YM, Chiang WC, Wu KD, Tsai TJ. Effect of pentoxifylline in addition to losartan on proteinuria and GFR in CKD: A 12-month randomized trial. *Am J Kidney Dis.* 2008;52(3):464-74. <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.05.012>
- Yildirim Z, Kotuk M, Erdogan H, Iraz M, Yagmurca M, Kuku I, et al. Preventive effect of melatonin on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *J Pineal Res.* 2006;40(1):27-33. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00272.x>
- Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In: Armstrong D, editor. *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy.* New York: Plenum Press; 1994. p. 1-15. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-1833-4_1
- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med.* 1975;85(2):337-41.
- ELLMAN GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70-7. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Koksel O, Yildirim C, Cinel L, Tamer L, Ozdulger A, Bastürk M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates lung tissue damage after hind limb ischemia-reperfusion in rats. *Pharmacol Res.* 2005;51(5):453-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2004.11.007>
- Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med.* 1993;21(9):1376-86. <http://dx.doi.org/10.1097/00003246-199309000-00023>
- Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.* 1999;49(2):91-102. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1827.1999.00829.x>
- Brivida K, Sies H. Non-enzymatic antioxidant defense system. In Frei B, editor. *Natural antioxidants in human health and disease.* San Diego: Academic Press; 1994. p. 107-28.
- de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(1-2):202-26. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00196-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00196-8)
- Holdiness MR. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clin Pharmacokinet.* 1991;20(2):123-134. <http://dx.doi.org/10.2165/00003088-199120020-00004>
- Taktfooladi MA, Jahanshahi A, Sotoudeh A, Daneshi MH, Khansari M, Taktfooladi HA. The antioxidant role of N-acetylcysteine on the testicular remote injury after skeletal muscle ischemia and reperfusion in rats. *Pol J Pathol.* 2013;64(3):204-9. <http://dx.doi.org/10.5114/pjp.2013.38140>
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989;6(6):593-7. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90066-X](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(89)90066-X)
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and

- reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2000;47(3):537-48. [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00018-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00018-3)
26. Sehirli AO, Sener G, Satiroglu H, Ayanoğlu-Dülger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Nephrol.* 2003;16(1):75-80.
 27. DiMari J, Megyesi J, Udvarhelyi N, Price P, Davis R, Safirstein R. N-acetyl cysteine ameliorates ischemic renal failure. *Am J Physiol.* 1997;272(3 Pt 2):292-8.
 28. Da Silveira M, Yoshida WB. Trimetazidine and N-acetylcysteine in attenuating hind-limb ischemia and reperfusion injuries: experimental study in rats. *Int Angiol.* 2009;28(5):412-7.
 29. Shimizu MH, Danilovic A, Andrade L, Volpini RA, Libório AB, Sanches TR, et al. N-acetylcysteine protects against renal injury following bilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(10):3067-73. <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfn237>
 30. Stafford-Smith M. Evidence-based renal protection in cardiac surgery. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2005;9(1):65-76. <http://dx.doi.org/10.1177/108925320500900107>
 31. Emreçan B, Tulukoglu E, Bozok S, Kestelli M, Onem G, Küpelioglu A, et al. Effects of Iloprost and pentoxifylline on renal ischemia-reperfusion in rabbit model. *Eur J Med Res.* 2006;11(7):295-9.
 32. Dávila-Esqueda ME, Martínez-Morales F. Pentoxifylline diminishes the oxidative damage to renal tissue induced by streptozotocin in the rat. *Exp Diabetes Res.* 2004;5(4):245-51. <http://dx.doi.org/10.1080/154386090897974>
 33. Gunduz Z, Canoz O, Per H, Dusunsel R, Poyrazoglu MH, Tez C, et al. The effects of pentoxifylline on diabetic renal changes in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Ren Fail.* 2004;26(6):597-605. <http://dx.doi.org/10.1081/JDI-200038329>
 34. Vadie K, Brunner LJ, Luke DR. Effects of pentoxifylline in experimental acute renal failure. *Kidney Int.* 1989;36(3):466-70. <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1989.218>
 35. Savaş S, Delibaş N, Savaş C, Sütçü R, Cindaş A. Pentoxifylline reduces biochemical markers of ischemia-reperfusion induced spinal cord injury in rabbits. *Spinal Cord.* 2002;40(5):224-9. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.sc.3101281>
 36. Zaitone S, Hassan N, El-Orabi N, El-Awady el-S. Pentoxifylline and melatonin in combination with pioglitazone ameliorate experimental non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Pharmacol.* 2011;662(1-3):70-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.049>