

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

PPG CBIOL

Dissertação

**Efeitos da instilação
intranasal do surfactante
exógeno sobre a lesão
pulmonar induzida pelo
ventilador mecânico em ratos
Wistar saudáveis**

Rafael Neto Chirico

Ouro Preto
2019



EFEITOS DA INSTILAÇÃO INTRANASAL DO SURFACTANTE EXÓGENO
SOBRE A LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELO VENTILADOR MECÂNICO
EM RATOS WISTAR SAUDÁVEIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

Co-orientadora: Dra. Natália Alves de Matos

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C541e Chirico, Rafael Neto .

Efeitos da instilação intranasal do surfactante exógeno sobre a lesão pulmonar induzida pelo ventilador mecânico em ratos Wistar saudáveis. [manuscrito] / Rafael Neto Chirico. - 2019.

84 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra.

Coorientadora: Dra. Natalia Alves Matos.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Respiração artificial. 2. Agentes ativos de superfícies. 4. Stress oxidativo. I. Bezerra, Frank Silva. II. Matos, Natalia Alves. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 611.24:616-001

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6 1589



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 29 dias do mês de novembro do ano de 2019, às 13:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação do mestrando Rafael Neto Chirico, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Frank Silva Bezerra (Presidente - UFOP), pela Profa. Dra. Maria da Glória Rodrigues-Machado (Membro - Externo), pelo Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes (Membro - UFOP) e pela Dra. Natália Alves de Matos (Co-Orientadora - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu ao mestrando 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Efeitos da Instilação Intranasal do Surfactante Exógeno Sobre a Lesão Pulmonar Induzida Pelo Ventilador Mecânico em Ratos Wistar Saudáveis", na área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos para perguntas e respostas ao candidato sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro Profa. Dra. Maria da Glória Rodrigues-Machado; segundo Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes; terceiro Dra. Natália Alves de Matos; quarto Prof. Dr. Frank Silva Bezerra. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que o mestrando foi aprovado por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pelo mestrando. Ouro Preto, 29 de novembro de 2019.

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

Presidente

Dra. Natália Alves de Matos

Profa. Dra. Maria da Glória Rodrigues-Machado

Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

Mestrando

Este Trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx) do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), na vigência de auxílio concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e meus avós, que de maneira única, me ajudaram e me ajudam a ser uma pessoa melhor a cada dia, pois a família representa a base para a conquista de tudo em nossas vidas.

AGRADECIMENTOS ACADÊMICOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu a possibilidade de alcançar mais uma meta da minha vida, tão importante quanto a todas as outras pois tudo é aprendido para compartilharmos. Devemos absorver o melhor de cada situação, pois é o caminho mais curto da nossa evolução nessa experiência humana.

Ao meu orientador Prof. Dr. Frank Silva Bezerra pela oportunidade dada de poder conviver com pessoas dedicadas à busca de conhecimento, inovação e pesquisa. Sou verdadeiramente grato por todo apoio que me deste.

À minha co-orientadora Dra. Natália Alves de Matos também devo toda gratidão, por ser uma pessoa extremamente empenhada e comprometida com suas metas, e de grande empatia, pois além de muito competente, está sempre a ouvir, se colocando igualmente a todos os demais membros do laboratório com simplicidade. Muito sucesso é o que desejo em tudo na sua vida.

Aos professores Luis Eduardo de Souza, que também me concedeu uma grande oportunidade, e tem todo meu respeito por sua competência, e à professora Silvia Cangussú, que ajuda a todos no laboratório, sem medir esforços! Todos os demais professores do programa de mestrado que colaboraram cada qual com seu imenso conhecimento.

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo suporte de uma grande instituição que é, e que precisa ser valorizada.

Ao Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx), Laboratório de Imunopatologia (LIMP), Laboratório de Imunopatologia (Labiin) e Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC) por todo apoio, por todos os membros dessa equipe fantástica, pela auxílio para meu crescimento pessoal e acadêmico, Thalles, Gabriel, Andrea, Matheus, Laisy, Amanda, Ana Beatriz, Michel, Ruy, Mônica, Daniela, Natália Araújo, Érica, Sophia e Pedro, minha prima Máira e Aline, ao senhor Luizinho e ao amigo Leandro, que me deu muita força em momentos difíceis! Também quero deixar de forma especial, a lembrança de uma pessoa com quem convivi pouquíssimo, mas que passou muito conhecimento, à memória de Keila, uma aluna exemplar para toda a universidade. Muito obrigado, Keila!

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP;

A CAPES, CNPq, Fapemig e Nova Biomedical pelo apoio financeiro;

À Banca Examinadora pela atenção dispensada na leitura desse trabalho;

Ao Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ouro Preto, pela parceria e contribuições.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Agradeço à minha família, que sempre esteve ao meu lado, meu pai Dirceu, que não está presente fisicamente, mas que torce por mim, onde quer que esteja. Minha mãe Vanda, sempre ao meu lado, me apoiando. Meus irmãos Rodrigo e Renata, que amo muito, e que contribuem também para ser quem sou hoje. Meus Sobrinhos Eduardo, Victor, Manuella e Isabella. Meus avós, que também já partiram, mas que olham por mim ainda, não tenho dúvidas disso!!!

Enfim.....tudo que vivi neste período de mestrado, me fez crescer, conheci pessoas, algumas pude me aproximar, outras não foi possível como eu desejava. A vida às vezes nos coloca situações inesperadas, mas como já foi dito, tudo é aprendido, e acontece por algum propósito.

Muitíssimo obrigado a todos!

RESUMO

A ventilação mecânica (VM) é essencial para manter as trocas gasosas adequadas no paciente crítico, todavia, apesar de salvar vidas, o ventilador mecânico promove a inflamação, bem como lesões irreversíveis no parênquima pulmonar de pacientes sob VM. O surfactante pulmonar, um composto fosfolipídico com propriedades tensoativas produzido pelos pneumócitos do tipo II, atua como agente terapêutico para prevenir o colapso alveolar e, recentes estudos demonstraram que esse composto possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes em diferentes modelos experimentais. Portanto, este estudo objetivou investigar os efeitos da administração intranasal de surfactante exógeno na lesão pulmonar induzida pelo ventilador em ratos Wistar saudáveis. Métodos: trinta e dois ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: controle (GC), Grupo Surfactante (GS); Grupo ventilação mecânica (GVM) e ventilação mecânica pré-tratado com surfactante (GVMS). Os animais do GC e GS permaneceram sob ventilação espontânea por 1h, e o GVM, GVMS foram submetidos à sedação, anestesia e curarizados e então, ventilados mecanicamente por 1h (volume corrente de 12 mL/kg, frequência respiratória de 80 ciclos/minuto e uma pressão positiva expiratória final (PEEP) de 3 cmH₂O). Ao fim do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e o lavado broncoalveolar (LBA), o sangue arterial e os pulmões foram colhidos para se fazer as análises morfométricas e bioquímicas. As análises estatísticas foram feitas com o uso do GraphPadPrism. Os dados foram expressos como média \pm EPM ou mediana, valor mínimo e máximo e o $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Resultados: Na análise dos gases sanguíneos arteriais, houve aumento do pH e pO₂ em GVM e GVMS em relação ao GC e GS. Em relação ao pCO₂ e aos níveis de bicarbonato (HCO₃), houve diminuição em GVM e GVMS comparados ao GC e GS, à saturação de oxigênio (SpO₂) houve aumento em GVM e GVMS comparado ao GS. Na análise da função pulmonar, observou-se que o volume corrente e volume-minuto foram maiores no GVM e GVMS em comparação ao GC e GS. No LBA, foi observado aumento de leucócitos totais, macrófagos, linfócitos e neutrófilos no grupo GVM comparado a GC e GS, e o pré-tratamento com surfactante promoveu uma diminuição no grupo GVMS comparado ao grupo GVM, em todos os tipos celulares. As atividade das enzimas SOD e CAT aumentaram no GVM comparado ao GC e GS, e no GVMS teve diminuição das mesmas em relação a GVM. Em relação ao dano tecidual, houve maior peroxidação lipídica e oxidação protéica em GVM comparado a GC e GS, sendo que houve diminuição em GVMS em relação a GVM. Em relação as citocinas inflamatórias os níveis de CCL2, IL-1, IL-6 e TNF- α foram maiores em GVM comparado ao GC e GS, e houve diminuição em GVMS quando comparado ao GVM. Quanto às análises estereológicas, a densidade do espaço alveolar foi maior em GVM em relação aos grupos GC e GS e menor em GVMS comparado a GVM, enquanto houve redução da densidade de volume dos septos alveolares em GVM em relação a GC e GS, e aumento em GVMS comparado ao grupo GVM. Conclusão: A instilação intranasal com surfactante exógeno foi capaz de reduzir lesão pulmonar induzida pelo ventilador mecânico em ratos Wistar adultos saudáveis.

Palavras-chave: ventilação mecânica; surfactante; inflamação pulmonar; volume corrente; desequilíbrio redox

Financiamento: CNPq, CAPES, FAPEMIG, UFOP e Nova Biomedical Corporation

ABSTRACT

Mechanical ventilation (MV) is essential to maintain adequate gas exchange in critically ill patients; however, despite saving lives, the mechanical ventilator promotes inflammation as well as irreversible lesions in the pulmonary parenchyma of MV patients. Pulmonary surfactant, a phospholipid compound with surfactant properties produced by type II pneumocytes, acts as a therapeutic agent to prevent alveolar collapse, and recent studies have shown that this compound has anti-inflammatory and antioxidant properties in different experimental models. Therefore, this study aimed to investigate the effects of intranasal administration of exogenous surfactant on ventilator-induced lung injury in healthy Wistar rats. Methods: Thirty-two male Wistar rats were divided into four groups: control (CG), Surfactant (SG); Mechanical ventilation (MVG) and surfactant pretreated mechanical ventilation (SPMVG). The CG and SG animals remained under spontaneous ventilation for 1h, and the MVG, MVSG were submitted to sedation, anesthesia and curarization, and then mechanically ventilated for 1h (tidal volume of 12 mL/kg, respiratory rate of 80 cycles/minute and positive end-expiratory pressure (PEEP) of 3 cmH₂O). At the end of the experimental protocol, the animals were euthanized and bronchoalveolar lavage (BAL), arterial blood and lungs were collected for morphometric and biochemical analyzes. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism. Data were expressed as mean \pm SEM or median, minimum and maximum values, and $p < 0.05$ was considered statistically significant. Results: In the analysis of arterial blood gases, there was an increase in pH and pO₂ in MVG and SPMVG compared to CG and SG. Regarding pCO₂ and bicarbonate levels (HCO₃), there was a decrease in MVG and SPMVG compared to CG and SG, while oxygen saturation (SpO₂) increased in MVG and MVSG compared to SG. In the analysis of lung function, tidal volume and minute volume were higher in MVG and SPMVG compared to CG and SG. In BAL, there was an increase in total leukocytes, macrophages, lymphocytes and neutrophils in the MVG compared to CG and SG, and surfactant pretreatment decreased the SPMVG compared to the MVG in all cell types. The enzyme activities of superoxide dismutase and catalase (SOD and CAT) increased in MVG compared to CG and SG. However, there was a decrease in SPMVG compared to MVG. Relating to tissue damage, there was a higher lipid peroxidation and protein oxidation in MVG compared to CG and SG, and there was a decrease in SPMVG compared to MVG. In relation to inflammatory cytokines, CCL2, IL-1, IL-6 and TNF- α levels were higher in MVG compared to CG and SG, and there was a decrease in SPMVG compared to MVG. In the stereological analyzes, the volume density of alveolar space was higher in MVG compared to CG and SG, it was lower in SPMVG compared to MVG, while there was a reduction in the volume density of alveolar septa in MVG compared to CG and SG, and an increase in SPMVG compared to the MVG. Conclusion: the pretreatment with exogenous surfactant was able to reduce the ventilator induced lung injury in healthy adult rats.

Keywords: mechanical ventilation; surfactant; pulmonary inflammation; Tidal volume; redox imbalance;

Funding: CNPq, CAPES, FAPEMIG, UFOP and Nova Biomedical Corporation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura externa e interna dos pulmões.	19
Figura 2. Estrutura alveolar e suas organelas.	20
Figura 3. Demonstração do ventilador tanque de John Dalziel.....	23
Figura 4. Exemplar de um Pulmão de Ferro idealizado por Drinker.	24
Figura 5. Demonstração de um Pulmotor de Drager.....	25
Figura 6. Modelo de ventilador mecânico nos dias atuais.	27
Figura 7. As consequências estruturais e alterações biológicas que ocorrem no alvéolo por atelectasia e barotrauma.	29
Figura 8. Molécula de Fosfatidilcolina, um dos componentes mais abundantes do surfactante pulmonar.	33
Figura 9. Pneumócito tipo II e o mecanismo de síntese do surfactante.	34
Figura 10. Mecanismo de ação das enzimas aintioxidantes.....	37
Figura 11. Célula inflamatória no lavado broncoalveolar.	54
Figura 12. Análises estereológicas das secções pulmonares.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Curva padrão de albumina.....	46
Tabela 2. Reagentes utilizados para a análise da atividade da Superóxido Dismutase	47
Tabela 3. Curva padrão para análise de glutathione total.....	48
Tabela 4. Reagentes para a análise de Glutathione	49
Tabela 5. Análise de gases sanguíneos e função pulmonar em ratos wistar	53
Tabela 6. Biomarcadores do estresse oxidativo no parênquima pulmonar de animais	55
Tabela 7. Marcadores Inflamatórios no Parênquima Pulmonar	56

LISTA DE ABREVIATURAS

BHT: butil hidróxitolueno

CAT: catalase

CCA: Centro de Ciência Animal

CCL3: Ligante do receptor de quimiocina CC3

CCL5: Ligante do receptor de quimiocina CC5

CO₂: dióxido de carbono

CPT: Capacidade Pulmonar Total

CRF: Capacidade Residual Funcional

CEUA: Comitê de Ética na Utilização de Animais

CuSOD: Superóxido dismutase de cobre

DMSO : dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FiO₂: Fração Inspirada de Oxigênio

FR: frequência respiratória

GC: Grupo Controle

GPx: glutationa peroxidase

GRd: glutationa redutase

GS: Grupo Surfactante

GSH: Glutationa reduzida

GSSG: Glutationa oxidada

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

IL-1 α : interleucina-1 alfa

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

IL-10: interleucina-10

IL-1 β : interleucina -1-beta

IRA: Insuficiência Respiratória Aguda

IRH: Insuficiência Respiratória Hipoxêmica

LBA: Lavado Broncoalveolar

LPIV: Lesão Pulmonar induzida por Ventilação Mecânica

LPS: Lipopolissacarídeo

MIP-1 α : Proteína inflamatória de macrófagos-1alfa

MIP-1 β : Proteína inflamatória de macrófagos-1-beta

MnSOD: Superóxido dismutase de manganês

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difenilterazolio]

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NF- κ B: fator nuclear kappa beta

NK: células Natural Killer

O₂: oxigênio

O₂⁻: Ânion superóxido

OH \cdot : Radical Hidroxila

PaCO₂: Pressão Parcial de Dióxido de Carbono

PAM: Pressão Arterial Média

PaO₂: Pressão Parcial de Oxigênio

PAP: Pressão Arterial Pulsátil

PC: Fosfatidilcolina

PEEP: Pressão Positiva Expiratória Final

PL: Fosfolipídios

RE: Retículo Endoplasmático

RLO: radicais livres de oxigênio

SARA: Síndrome da Angústia Respiratória Aguda

SDR: Síndrome do Desconforto Respiratório

SOD: Superóxido Dismutase

SP-A: proteína surfactante A

SP-B: proteína surfactante B

SP-C: proteína surfactante C

SP-D: proteína surfactante D

SRDA: Síndrome do desconforto respiratório agudo

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEA: Trietanolamina

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

VCV: Ventilação Controlada a Volume

VM:ventilação mecânica

VNI:Ventilação Não Invasiva

VPN: Ventilação por Pressão Negativa

VPP: Ventilação por Pressão Positiva

VPT: Volume Pulmonar Total

VT: volume corrente

Vv [a]: Densidade de volume de alvéolo

Vv [as]: Densidade de volume de septo alveolar

ZnSOD: Superóxido dismutase de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Estruturas Pulmonares	19
2.2 História da Ventilação Mecânica.....	21
2.2.1 Ventilação por Pressão Negativa.....	22
2.2.2 Ventilação por Pressão Positiva	24
2.2.3 A ventilação Mecânica atual	26
2.3 Lesão Pulmonar Induzida pela ventilação mecânica (LIPV)	28
2.3.1 Biotrauma, Volutrauma e Barotrauma.....	29
2.3.2 Aplicação de altos volumes correntes.....	30
2.3.3 A PEEP e sua importância	31
2.4 Surfactante (composição, função e síntese)	32
2.5 Estresse oxidativo.....	35
2.6 Agentes da inflamação	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS:	41
4.1 Animais.....	41
4.2 Grupos experimentais	41
4.3 Administração do Surfactante:.....	42
4.4 Ventilação Espontânea.....	42
4.5 Ventilação Mecânica	42
4.6 Coleta de sangue	43
4.7 Coleta do lavado broncoalveolar (LBA)	43
4.8 Coleta dos pulmões para análises histológicas	44
4.9 Análises Estereológicas do parênquima pulmonar	45
4.10 Homogenato pulmonar	45
4.11 Biomarcadores do Estresse Oxidativo.....	45
4.11.1 Proteínas Totais.....	45
4.11.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	46
4.11.3 Atividade da catalase	47
4.11.4 Sistema Glutathiona	48

4.11.5 Análise do Dano Oxidativo, TBARS.....	49
4.11.6 Dosagem da proteína carbonilada	50
4.12 Ensaio Imunoenzimático do Parênquima Pulmonar	51
4.13 Análises estatísticas.....	52
5. RESULTADOS	53
5.1 Avaliação da gasometria arterial e da função pulmonar	53
5.2 Análise do influxo de células no lavado broncoalveolar (LBA).....	54
5.3 Biomarcadores do Estresse oxidativo	55
5.4 Análises Imunoenzimáticas	56
5.5 Estereologia.....	57
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
Anexo 1. Certificado de Aprovação do CEUA.....	83
Anexo 2. Certificado de apresentação de pôster	84

1. INTRODUÇÃO

A ventilação mecânica (VM) é uma terapia de grande importância nos casos de síndrome de desconforto respiratório agudo (SDRA), pois proporciona a oxigenação ideal, bem como preserva a musculatura respiratória (MAZULLO FILHO; BONA; ROSA; SILVA *et al.*, 2012; NARDELLI; UFRJ; GARCIA; UFRJ *et al.*, 2007). A Lesão Pulmonar induzida pela Ventilação Mecânica (LPIV), ao longo de anos, se restringiu ao pneumotórax acometido pela elevação da pressão nas vias aéreas (barotrauma). No entanto, estudos demonstraram que a ventilação mecânica pode exacerbar uma lesão pulmonar já instalada, através do edema em regiões do interstício e do alvéolo, devido ao aumento de permeabilidade capilar e lesões teciduais em animais submetidos a VM (COIMBRA; UNIVERSITY OF CALIFORNIA SAN DIEGO; SILVERIO; UNIVERSITY OF CALIFORNIA SAN DIEGO, 2001; DREYFUSS; SAUMON, 1998).

Em geral, as modificações histológicas evidenciadas nas lesões pulmonares induzidas pela ventilação mecânica são análogas às mesmas causadas pela SDRA, e deflagram tal evento associado à duração da ventilação, bem como a extensão de estímulo da lesão. A VM quando em elevadas pressões transpulmonares resulta em lesões difusas dos alvéolos pela membrana hialina, hemorragia nos alvéolos e o infiltrado de neutrófilos (NARDELLI; GARCIA; PASSARO; ROCCO, 2007). Alguns estudos experimentais evidenciaram que pressões e volumes acima dos valores fisiológicos podem levar ao surgimento de lesões nos pulmões (DREYFUSS; SAUMON, 1998; VILLAR; KACMAREK; HEDENSTIERNA, 2004) através do aumento dos níveis de citocinas pró inflamatórias (BAILEY; MARTIN; ZHAO; VELDHUIZEN, 2003; HALBERTSMA; VANEKER; SCHEFFER; VAN DER HOEVEN, 2005). Frequentemente, a aplicação da pressão positiva ao final de expiração (PEEP) em situações de colapso dos alvéolos se destina a melhorar o processo de hematose, por elevação da Pressão Parcial de Oxigênio (PaO_2) e a diminuição da Pressão Parcial de Dióxido de Carbono ($PaCO_2$), com isso, ocorre o recrutamento alveolar que também diminui o shunt (perfusão, porém a ventilação reduzida) dos pulmões e o efeito no espaço morto (ventilação, porém a perfusão reduzida) (ANDRADE; SOUZA; HORTA; PAULA COSTA *et al.*, 2018).

As unidades alveolares e ductos dos alvéolos perdem a dependência entre as estruturas do parênquima pulmonar ao entrarem em colapso na fase expiratória, gerando modificações importantes e patológicas responsáveis por serem gatilho para evolução da LPIV, como por exemplo, a desestabilização pulmonar causada por abertura e fechamento de alvéolos de forma repetitiva em cada ciclo ventilatório (NIEMAN; ANDREWS; SATALIN; WILCOX *et al.*, 2018). Nas estruturas alveolares ocorre uma dinâmica de elevada tensão em sua superfície que é gerada por uma fina camada de água, para alívio dos pulmões, os alvéolos possuem uma camada de surfactante, que faz o ajuste dessa tensão que é exercida no seu interior, otimizando o trabalho ventilatório e mantendo uma insuflação pulmonar mais homogênea (EL-GENDY; KAVIRATNA; BERKLAND; DHAR, 2013). Neste sentido, na busca pela estabilidade das regiões alveolares, torna-se necessário a produção e a liberação de surfactante, que ocorre através do estiramento dos pneumócitos do tipo II (FONTELA; PRESTES; FORGIARINI JR; FRIEDMAN, 2017). A lesão da estrutura alveolocapilar, quando ocorre junto à disfunção na microcirculação, e ainda à grande quantidade de fluídos nos alvéolos e deformidades na função básica do surfactante, por isso, o paciente portador de lesão pulmonar aguda e síndrome do desconforto respiratório apresenta severo desequilíbrio na ventilação–perfusão e em um quadro de hipoxemia (VIANA; SARGENTELLI; ARRUDA; WIRYAWAN *et al.*, 2004).

O surfactante, presente nos pulmões, apresenta como principal característica tornar a condição dos alvéolos estáveis no período expiratório do ciclo completo da ventilação, a fim de que não ocorra o colapsamento dessa região das vias aéreas e, conseqüentemente, um decréscimo do volume de área pulmonar. Na fase inspiratória, ocorre o que se denomina de recrutamento dos alvéolos de maneira uniforme por parte do surfactante, com a redução do volume pressórico estabelecido na área compreendida do interstício e alvéolo. É importante ressaltar, que o surfactante tem em sua composição características benéficas no que diz respeito a efeitos imunológicos, antibacterianos e anti-inflamatórios (HARUMI MIYOSHI, 2001).

Em sua constituição, o surfactante possui resumidamente, lipídios e proteínas (GOERKE, 1998; REBELLO; PAULO; EINSTEIN; PROENÇA *et al.*, 2002), sendo que 80 a 90% da massa total do surfactante é constituído por lipídios, principalmente fosfolipídios e lipídios neutros, como o colesterol, tendo como o representante de maior expressão dentro desta composição a fosfatidilcolina (HAAGSMAN; HOGENKAMP;

VAN EIJK; VELDHUIZEN, 2008; SILVA; MARON-GUTIERREZ; ROCCO; GARCIA, 2009). Os fosfolípidos realizam a redução da tensão superficial entre a interação ar-líquido que se faz presente dentro de cada alvéolo, impedindo assim que haja o colapsamento entre os alvéolos, uma vez que durante a expiração, as forças causadoras de tal evento se potencializam. Além dos lipídios, em torno de 10% de massa dessa estrutura é constituída por conteúdo protéico, de forma a destacar proteínas SP-A (proteína surfactante A), SP-B (proteína surfactante B), SP-C (proteína surfactante C) e SP-D (proteína surfactante D) (GOERKE, 1998; REBELLO; PAULO; EINSTEIN; PROENÇA *et al.*, 2002). As proteínas hidrofóbicas SP-B e SP-C, possuem funcionalidades que consistem em prevenir o colapsamento dos alvéolos, o que faz com que haja diminuição da tensão de superfície alveolar, já a SP-C tem função atribuída para a imunidade inata (AUGUSTO; SYNGUELAKIS; JOHANSSON; PEDRON *et al.*, 2003). As proteínas hidrofílicas SP-A e SP-D pertencem à família das colectinas e apresentam um papel de defesa do hospedeiro (HAWGOOD; POULAIN, 2001), sendo que a SP-A tem se mostrado importante dentre outras funções, no desempenho da estrutura do surfactante em sua porção extracelular, ou seja, na mielina tubular (WANG; GUO; DIANGELO; THOMAS *et al.*, 2010) e a SP-D confere relevante função na homeostase do surfactante (HAWGOOD; POULAIN, 2001; SILVEYRA; FLOROS, 2012).

Neste sentido, estudos clínicos demonstraram que a administração de surfactante exógeno modificado, cuja extração é de origem bovina, tem sido considerada uma modalidade padrão de terapia em pacientes com SDRA (ENGLE, 2008; ZUO; VELDHUIZEN; NEUMANN; PETERSEN *et al.*, 2008) e que o tratamento têm mostrado benefício à expansão secundária, ao aumento de complacência dos pulmões, à Capacidade Residual Funcional e diminuição do shunt dentro dos alvéolos, todavia, existem poucos estudos de modelos experimentais que associam a administração do surfactante e a ventilação mecânica em pequenos animais (CARVALHO; MÂNGIA, 1997). Portanto, o presente estudo avaliou os possíveis efeitos da instilação intranasal do surfactante exógeno em ratos Wistar submetidos à ventilação mecânica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estruturas Pulmonares

O processo da ventilação pulmonar depende de uma variedade de fatores ou elementos fundamentais neste contexto, como a frequência respiratória (FR), o volume corrente (VT), os tempos respiratórios e o fluxo (FONTELA; PRESTES; FORGIARINI JR; FRIEDMAN, 2017; TOBIN; CHADHA; JENOURI; BIRCH *et al.*, 1983). Classicamente, a fisiologia se refere ao movimento do sistema respiratório como a equação em que as pressões resistivas ao fluxo e as pressões elásticas são somadas (OTIS; FENN; RAHN, 1950). Portanto, a resistência ao fluxo é feita com a finalidade de levar o gás até os alvéolos, tanto no endotélio quanto no parênquima por atrito (FAFFE; ZIN, 2009; MARINI, 2019), a Figura 1 representa as estruturas externas e internas dos pulmões.

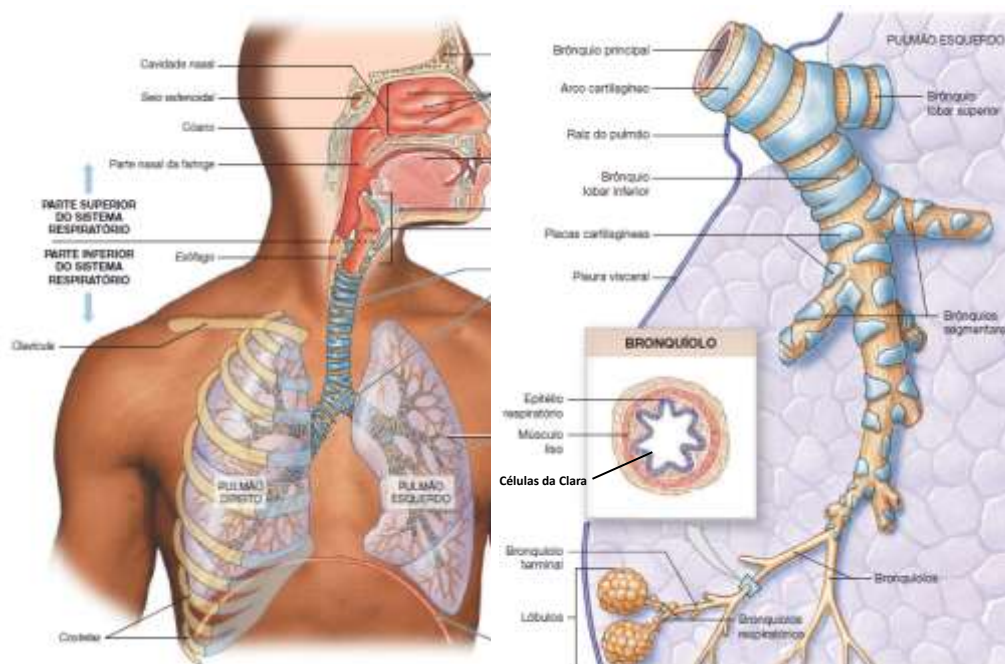


Figura 1. Ilustração de estrutura externa dos pulmões (lado esquerdo), e de seção de árvore brônquica, destacando o interior de um bronquíolo, onde se encontra a célula da Clara (lado direito).

Adaptado de Martini-Timons-Tallitsch, 2009

Nos pulmões, a matriz extracelular é composta por fibras elásticas, responsáveis pelas propriedades viscoelásticas do parênquima pulmonar, bem como as fibras colágenas, funções estruturais relacionadas ao parênquima pulmonar, são

responsáveis por limitar a Capacidade Pulmonar Total (GATTINONI; PESENTI, 2005; LOHSER; SLINGER, 2015). Com isso, a pressão transpulmonar (resultado da diferença entre a pressão intrapleural e pressão alveolar) se eleva durante o movimento inspiratório e é reduzida durante a expiração (BATES; IRVIN, 2002; KNUDSEN; OCHS, 2018). Nas paredes dos alvéolos são constituídas por células denominadas pneumócitos tipo I e os pneumócitos tipo II (CAPELOZZI, 2011; LOPES; NORONHA; MAFORT, 2010). Os pneumócitos tipo II que se caracterizam por possuírem organelas denominadas de corpos lamelares, os quais secretam e armazenam o surfactante nos alvéolos (Figura 2) (KNUDSEN; OCHS, 2018; WEIBEL, 1973).

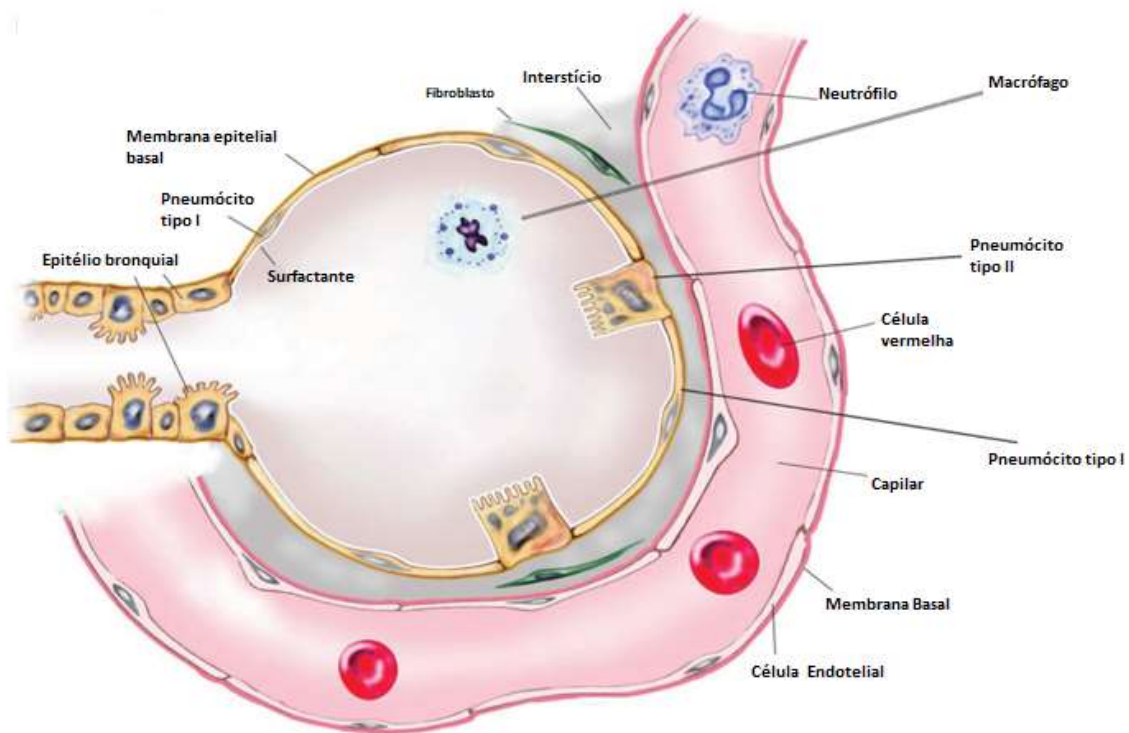


Figura 2. Estrutura alveolar e suas organelas.

Fonte: Adaptado de Grommes e colaboradores

Os alvéolos estão sempre sujeitos as alterações volumétricas, o que resulta em deformidades nas porções do ducto, e que podem gerar complicações nos septos interalveolares (VLAHAKIS; HUBMAYR, 2005). No entanto, em condições fisiológicas, a arquitetura pulmonar protege os septos alveolares contra a sobrecarga ocasionada por estresse mecânico (BACHOFEN; SCHURCH, 2001; KNUDSEN; OCHS, 2018).

Assim, a estrutura pulmonar, que se constitui de inúmeros alvéolos e capilares, está predisposta a ser lesionada por diferentes razões, tanto por natureza exógena, através de intercorrências do ambiente, como de agentes agressores já preexistentes no indivíduo (BERNARD; ARTIGAS; BRIGHAM; CARLET *et al.*, 1994; RAGHAVENDRAN; WILLSON; NOTTER, 2011). Portanto, a estrutura e integridade pulmonar é de extrema relevância para sua eficiência e otimização, a fim de que haja a correta transmissão e transferência de forças teciduais para uma adequada expansão das unidades alveolares e a manutenção da complacência pulmonar (MORIONDO; MARCOZZI; BIANCHIN; REGUZZONI *et al.*, 2012).

2.2 História da Ventilação Mecânica

O ato de ventilar significa realizar o deslocamento do ar do meio externo para dentro da cavidade alveolar. Os alvéolos representam microunidades e, em seu entorno, há presença de uma rede de vasos. Entre as estruturas do epitélio alveolar, interstício e o capilar do tecido ocorrem as trocas de gases. Todavia, a partir de alterações entre as estruturas ou mecanismos no processo das trocas gasosas, torna-se necessária a ventilação artificial ou mecânica (CARVALHO; TOUFEN JUNIOR; FRANCA, 2007).

A ventilação mecânica é uma modalidade de tratamento que confere sustentabilidade à vida do paciente acometido de insuficiência respiratória aguda, representando um procedimento muito usual praticado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (SLUTSKY, 2015). Historicamente, o notável médico e cientista grego, Galeno, no século II depois de Cristo, teve uma relevante atuação na iniciação dos estudos sobre a estrutura anatômica no intuito de compreender as doenças (SLUTSKY, 2015; STERNBACH; VARON; FROMM; SICURO *et al.*, 2001), a literatura sugere que ele tenha contribuído com a descoberta do uso da VM, uma vez que dentre seus experimentos, um deles foi utilizado foles nos pulmões de um animal morto, para inflá-lo, fazendo-o perceber que o animal poderia ser reanimado, mesmo sendo por um curto período (BAKER, 1971).

No entanto, já em meados do século XVI, Andreas Vesalius, de origem belga (Bruxelas), modificou toda essa ideia anterior proferida por Galeno. Ele despertou grande ira por parte da igreja devido à sua prática de dissecar cadáveres de humanos, no ano de 1543, Vesalius publicou uma grande obra, cujo conteúdo parecia ser pioneiro

quanto a uma referência genuína sobre ventilação com pressão positiva, nos moldes como conhecemos atualmente, o título da obra foi “*De Humani Corporis Fabrica*” (SLUTSKY, 2015). Posteriormente, Robert Hooke, em seu primeiro experimento, em 10 de outubro de 1667, que foi citado nas *Transações Filosóficas*, em 24 de outubro, verificando que se mantinha um cão vivo com ausência de movimentos respiratórios havendo um fluxo de ar constante em direção ao animal, a experiência obteve resultados convincentes, pois assim conseguiu-se demonstrar que os movimentos cardíacos não dependiam dos movimentos respiratórios, algo que não se acreditava antes deste resultado (BAKER, 1971).

Baker, em 1742, estabeleceu alguns relatos de ressuscitação aérea expirada ocorrida em recém-nascidos e, também em adultos em 1744, quando um mineiro asfíxiado retornou à vida, quando submetido a uma ressuscitação boca-a-boca, no século XVIII, este se tornou um método considerado de ponta dentro da ventilação artificial aceito nos casos de vítimas por afogamento, porém, mais tarde, a utilização de fole viria a substituir este processo de ressuscitação boca-a-boca (YOUNG; SYKES, 1990).

2.2.1 Ventilação por Pressão Negativa

A Ventilação por Pressão Negativa (VPN) consiste na utilização de uma câmara rígida, onde fica apenas o tórax (ventiladores de couraça) ou ainda os ventiladores que funcionam com o corpo todo dentro na câmara, exceto a cabeça (respirador de tanque). Ocorre uma redução cíclica de pressão na câmara através de uma bomba de deslocamento de alto volume, fazendo com que ocorra a expansão e retração pulmonar (YOUNG; SYKES, 1990). A aplicação clínica desses respiradores se deu em pacientes com paralisia da musculatura respiratória, causada por poliomielite, por meio dos chamados pulmões de aço (MEDEIROS; ALEGRETTI; BADALOTTO; MARASCHIN *et al.*, 2012; PÁDUA; MARTINEZ, 2001).

As primeiras referências de um ventilador a pressão negativa foram com um equipamento utilizando o corpo, do pescoço para baixo. O “ventilador tanque” teve a primeira descrição por meio de John Dalziel, um médico escocês, em 1838. Como ilustrado na Figura 3, o paciente permanecia em posição sentada em uma caixa hermeticamente fechada e a pressão negativa era fornecida com o bombeamento manual

de ar em direção ao interior da caixa. Havia também um manômetro para avaliar a intensidade de pressão negativa que estava sendo exercida no sistema (EICHEL; DREUX, 2017; KACMAREK, 2011).

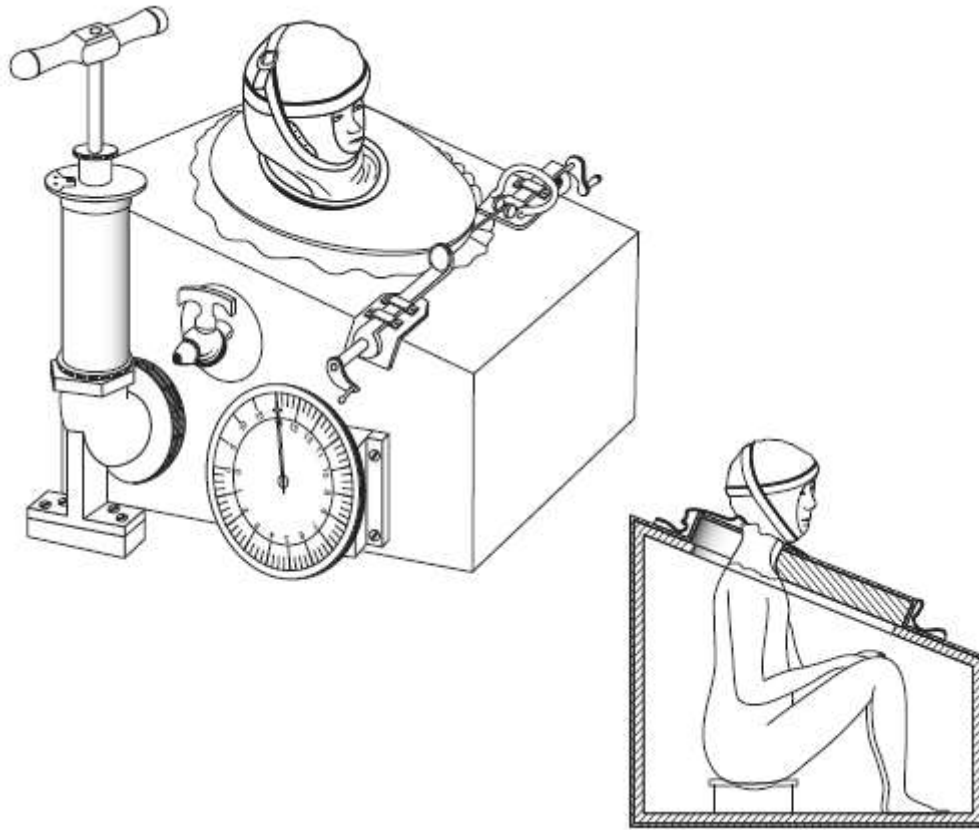


Figura 3. Demonstração do ventilador tanque de John Dalziel.

Fonte: adaptado de Slutsky (2015)

Com o princípio de trabalho semelhante ao respirador de tanque, porém revestindo somente a região do tórax e não todo o corpo, como faziam os respiradores – tanque, Waldenburg, no ano de 1880, desenvolveu um respirador de couraça (BAKER, 1971). A VPN se estabeleceu na clínica com maior notoriedade com o advento dos pulmões de ferro, como demonstra a Figura 4, planejado e construído por Drinker e Shaw (DRINKER; SHAW, 1929), porém fabricados e comercializados por Emerson (MEHTA; HILL, 2001). Essa tecnologia alcançou o ápice no curso da epidemia mundial de Poliomielite entre 1930 e 1960 (KACMAREK, 2011; SWEETNAM, 1953), embora no início foi pouco inserida na prática médica (DRINKER; SHAW, 1929; MARINI, 2013), basicamente se trata de um respirador com 2 metros de comprimento,

chegando a pesar 600 kg, com uma câmara de pressão hermética em metal, um cilindro de interior oco, onde fica alojado o paciente, estando a cabeça para fora do equipamento (KROPP, 2013). No decorrer do século XIX e até a metade do século XX, o método de VPN foi predominantemente utilizado para dar suporte de terapia ventilatória (KACMAREK, 2011).



Figura 4. Exemplo de um Pulmão de Ferro idealizado por Drinker.

Fonte: adaptado de (KROPP, 2013)

2.2.2 Ventilação por Pressão Positiva

Em 1754, a partir da descrição do dióxido de carbono e o oxigênio, Priestley, Lavoisier e Scheele fizeram com que a ressuscitação boca-a-boca fosse ultrapassada pela Ventilação por Pressão Positiva (VPP), inicialmente com o uso de foles e, sucessivamente, com pistões. Nos pistões, por vezes, havia uma fase em que se fazia necessária a retirada dos mesmos, com intuito de auxílio expiratório, para favorecer o retorno venoso até o coração, em substituição à expiração (BAKER, 1971). Todavia, ao fim da imunização dos pacientes contra a Poliomielite, a VPP era mais vantajosa em pacientes que apresentavam a insuficiência respiratória em consequência da disfunção neuromuscular ocasionada pela doença (CHEN; STERNBACH; FROMM; VARON, 1998).

Em 1780, um ventilador manual acompanhado de bolsa e máscara foi dado como o primeiro dispositivo a utilizar a Ventilação Não Invasiva (VNI), lançado por Chaussier. Posteriormente, em 1887, um equipamento de fole mais moderno também com uma máscara foi demonstrado por Fell, e, no princípio do Século XX, em 1911, Dräger criou o pulmotor (Figura 5), que consistia em um aparelho de pressão positiva, cuja tecnologia o possibilitava operar de forma pneumática, e que foi então considerado muito importante, por salvar muitas vidas no período da primeira guerra mundial (KACMAREK, 2011). No entanto, o Pulmotor foi visto por Drinker e Mckhann como de baixa eficácia, dizendo ser “decepcionante”, pois relataram o fato de que os pacientes resistiam ao uso de máscara e assim acabavam por tornar o esforço do dispositivo inútil. Foi observado também que em um paciente, cuja vida foi preservada por dois dias pelo aparelho, apresentou rompimento de estômago e esôfago e constatou-se presença de conteúdo gástrico na cavidade mediastinal (CHEN; STERNBACH; FROMM; VARON, 1998).



Figura 5. Demonstração de um Pulmotor de Dräger.

Fonte: adaptado de Kacmarek (2011)

A década de 60 foi determinante para a evolução do modo ventilatório por pressão positiva, impulsionada com o progresso das áreas fisiológicas e cirúrgicas, bem como a percepção da necessidade de focar em questões como atelectasia em pós-operatório e lesões pulmonares traumáticas resultantes de conflitos respiratórios, e, posteriormente, a ventilação mecânica evoluiu no intuito de promover benefícios ao paciente (COLICE, 2013).

2.2.3 A ventilação Mecânica atual

A Ventilação Mecânica (VM) se baseia em um fornecimento de pressão positiva nas vias aéreas por meio da utilização do tubo endotraqueal (Figura 6), a fim de tratar pacientes acometidos pela Insuficiência Respiratória Aguda (IRA) ou ainda em situações crônico agudizadas. A VM objetiva a manutenção das trocas de gases, a diminuição de trabalho da musculatura que compõe o processo de ventilação (MORAES; ARAUJO; ARAÚJO; ROCHA *et al.*, 2018), bem como promoção de melhores resultados em distúrbios agudos provenientes das trocas gasosas, diminuição do excesso de insuflação e melhor harmonização entre o paciente e o ventilador (BARBAS; ÍSOLA; FARIAS; CAVALCANTI *et al.*, 2014). Além desses fatores é importante para manter a saturação arterial ideal de oxigênio; garantir a retirada de CO₂ de maneira eficaz, evitar valores elevados de PaCO₂, tentar manter os menores valores de FiO₂ (Fração Inspiratória de Oxigênio) para evitar concentrações tóxicas de O₂ e estabelecer um limite de pressões trans-alveolares entre 25 e 30 cmH₂O que equivale as pressões de Platô em 30-35 cmH₂O (CARVALHO; TOUFEN JUNIOR; FRANCA, 2007).

Em contrapartida, o uso da VM também tem sido relacionado a efeitos negativos que na maioria das vezes estão associados com a doença de base, com o tempo em que se mantém o paciente em suporte ventilatório, a técnica utilizada e o modo ventilatório (JERRE; BERALDO; SILVA; GASTALDI *et al.*, 2007). Em geral, os parâmetros na VM são ajustados no próprio aparelho (ventilador mecânico), que contém diferentes formas de programação, dentre as quais, as mais utilizadas são ventilação controlada a pressão e ventilação controlada a volume, que podem ser periodicamente alteradas, com a intenção de reproduzir os mesmos modos de ventilação espontânea em pessoas saudáveis (JERRE; BERALDO; SILVA; GASTALDI *et al.*, 2007).

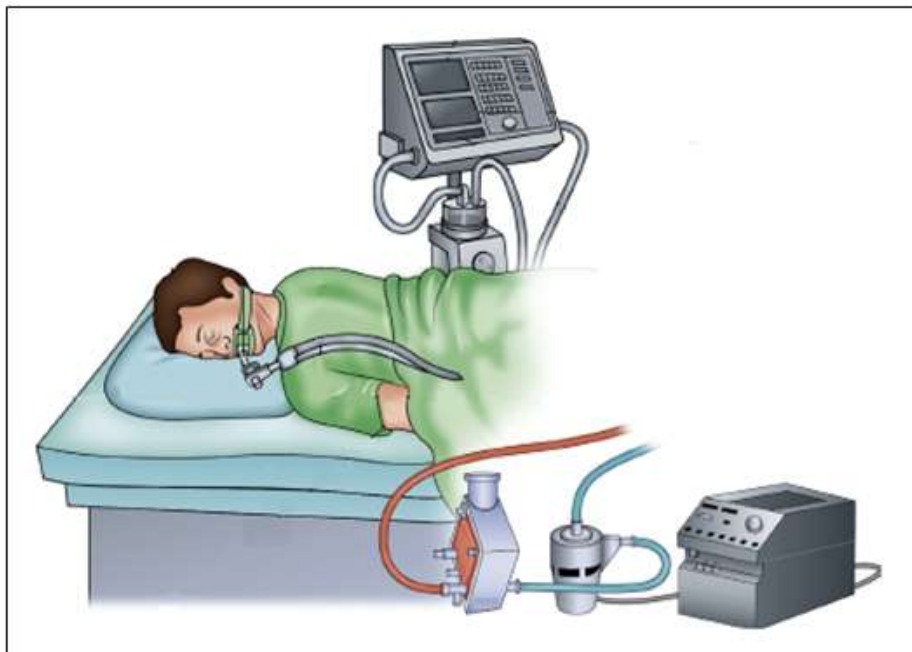


Figura 6. Modelo de ventilador mecânico nos dias atuais, paciente em posição prona.

Fonte: adaptado de Curley e colaboradores (2016)

O mecanismo fisiológico da VM consiste no recrutamento da estrutura pulmonar através do processo de insuflação, com efeito de equalizar o volume dos pulmões, através da distribuição mais homogênea do volume corrente (V_t), procurando obter equilíbrio da tensão nas estruturas pulmonares (MEAD; TAKISHIMA; LEITH, 1970). No entanto, é necessário que haja uma programação dos níveis pressóricos para prevenir episódios de atelectasia e hiperinsuflação pulmonar, com um mínimo de oxigênio necessário, uma vez que a insuflação excessiva potencializa riscos para vazamento de ar como pneumotórax, por outro lado, a pressão em níveis muito baixos durante a VM ocasiona atelectasia cíclica em determinadas áreas pulmonares na fase expiratória, podendo gerar prováveis processos inflamatórios (SWEET; CARNIELLI; GREISEN; HALLMAN *et al.*, 2017). A VM é capaz de influenciar os mecanismos fisiológicos, por exemplo (DREYFUSS; SAUMON, 1998), no decorrer da ventilação, a dinâmica ventilatória sofre repercussões advindas do próprio paciente tais como complacência, volume pulmonar, musculatura utilizada para ventilar e resistência nas vias aéreas. O volume estabelecido na inspiração, a pressão e o fluxo dessa inspiração são resultados da relação paciente-ventilador mecânico que necessitam de ajustes para

promover maior conforto para pacientes com demanda ventilatória aumentada e variável para evitar complicações clínicas (CAMPBELL; DAVIS, 2002).

2.3 Lesão Pulmonar Induzida pela ventilação mecânica (LIPV)

Em 1974, Webb e Tierney verificaram que a VM apesar dos fatores benéficos pode causar lesões nos pulmões de animais saudáveis, quando observaram que valores de pressão de pico inspiratório de 30 e 45 cmH₂O ocasionaram edema nas estruturas pulmonares observados após 20 e 60 minutos de VM em ratos (DE PROST; RICARD; SAUMON; DREYFUSS, 2011; WEBB; TIERNEY, 1974). Atualmente, sabe-se que a terapia da ventilação artificial que se destina à manutenção de hematose ideal durante a SDR pode acelerar todo o processo de inflamação pulmonar, (GRASSO; TERRAGNI; MASCIA; FANELLI *et al.*, 2004; OCHIAI, 2015; TREMBLAY; SLUTSKY, 2006), bem como levar a falência múltipla dos órgãos (KIM; CHUNG; SON; KIM *et al.*, 2014) que é resultado de resposta inflamatória inicial gerada em indivíduos em ventilação com parâmetros de volumes correntes elevados (CHESS; BENSON; MANISCALCO; WRIGHT *et al.*, 2010).

Em relação a LPIV, diversas forças mecânicas exercidas em áreas pulmonares, especificamente em células do epitélio tipo I e tipo II, células do endotélio, macrófagos, matriz extracelular e vias aéreas distais, durante a ventilação, contribuem para o início da lesão (DOS SANTOS; SLUTSKY, 2000; SILVA; NEGRINI; ROCCO, 2015) através da hiperdistensão dos alvéolos ou forças que causam deformações no processo de hiperdistensão alveolar ou não em movimentos repetitivos (CHEN; CHENG; LI; ZHANG, 2014).

Uma vez lesionadas, as células do epitélio possibilitam a entrada de fluídos no interior do alvéolo com redução da tensão superficial, o colapso da estrutura alveolar (CAPELOZZI, 2011), podendo levar à perda de função alveolar, e culminar em insuficiência respiratória no paciente (KELLY; FARAJ; ZHANG; MALTEPE *et al.*, 2019; VILLAR; SULEMANJI; KACMAREK, 2014). Outros parâmetros relacionados à LPIV se referem ao alto volume corrente associado à elevada pressão transpulmonar, alta distensão e colapso dos alvéolos de maneira contínua, bem como baixos valores de volume corrente na expiração, como já foi observado em animais ventilados com 6 mL/kg repercutindo na desativação do surfactante (CHEN; CHENG; LI; ZHANG, 2014; COIMBRA; UNIVERSITY OF CALIFORNIA SAN DIEGO; SILVERIO;

UNIVERSITY OF CALIFORNIA SAN DIEGO, 2001; MARCY; MARINI, 1991; ROY; HABASHI; SADOWITZ; ANDREWS *et al.*, 2013).

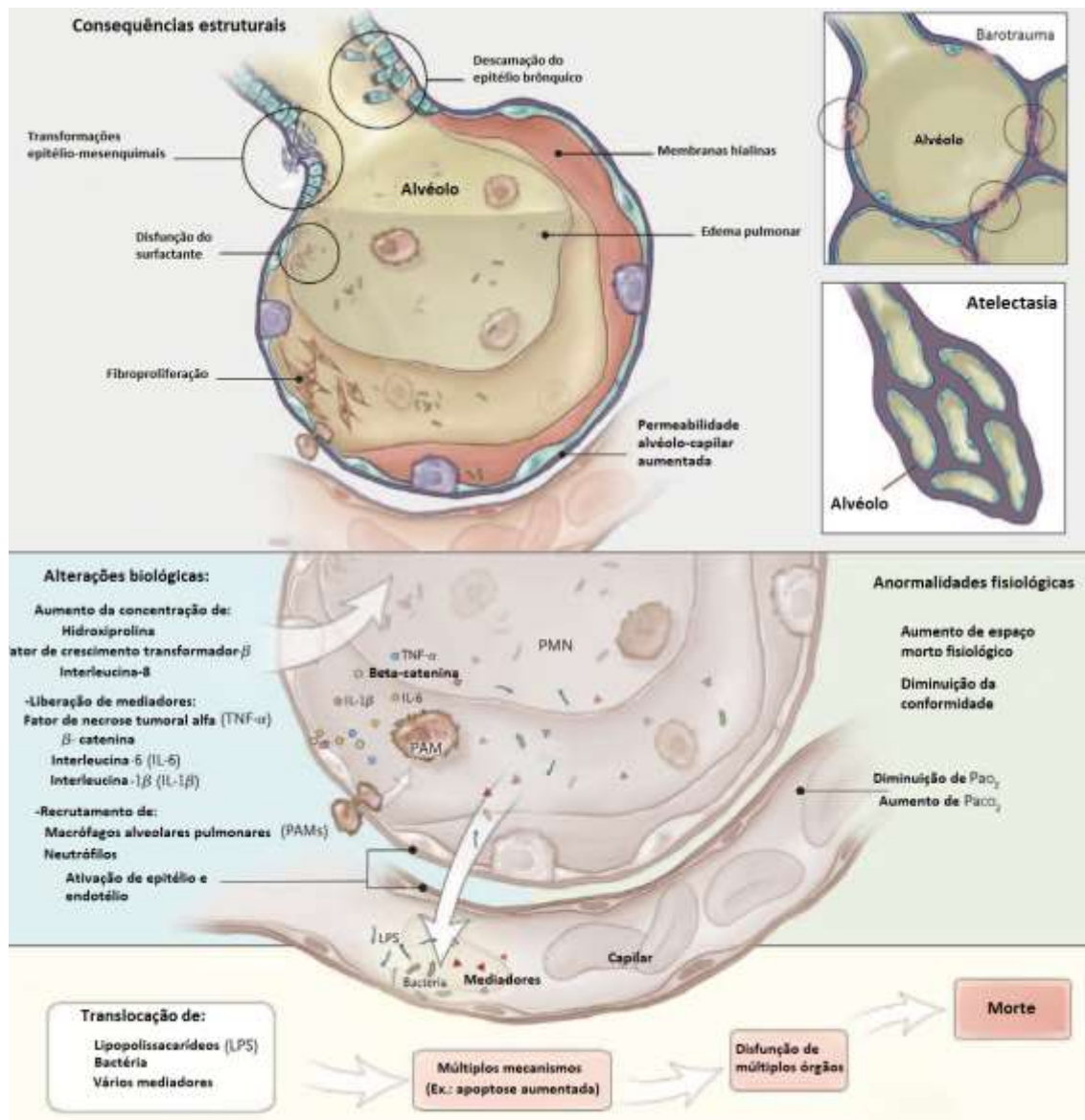


Figura 7. As consequências estruturais e alterações biológicas que ocorrem no alvéolo por atelectasia e barotrauma. Essas alterações irão causar biotrauma, que é o processo inflamatório provocado pelos estímulos mecânicos decorrentes da ventilação mecânica. Fonte: Adaptado de (LOHSER; SLINGER, 2015)

2.3.1 Biotrauma, Volutrauma e Barotrauma

As estratégias ventilatórias lesivas adotadas geram o biotrauma, que é um processo onde forças biofísicas podem alterar a fisiologia das células pulmonares, induzindo ao aumento dos níveis de mediadores inflamatórios (BEITLER;

MALHOTRA; THOMPSON, 2016; TREMBLAY; VALENZA; RIBEIRO; LI *et al.*, 1997; TREMBLAY; SLUTSKY, 1998).

O processo de estiramento cíclico dos alvéolos leva ao colapso alveolar, resultando em dano no revestimento epitelial causado pelas forças exercidas nas interfaces com diferentes volumes é conhecido como lesão por volutrauma (HUSSEIN; WALTERS; STROETZ; VALENCIA *et al.*, 2013). O volutrauma é considerado grande vilão da lesão pulmonar causada pela ventilação mecânica, sendo portanto, motivo para a utilização da Pressão Positiva Expiratória Final (PEEP), (ARGIRAS; BLAKELEY; DUNNILL; OTREMSKI *et al.*, 1987) com a intenção de prevenir novos episódios de colapso (FAN; VILLAR; SLUTSKY, 2013; JABBARI; ALIJANPOUR; AMRI MALEH; HEIDARI, 2013; TREMBLAY; SLUTSKY, 2006).

O termo “Barotrauma” foi utilizado por clínicos a fim de relatar a ventilação realizada com altas pressões de pico, causando o dano pulmonar. O exemplo mais clássico é o pneumotórax (DE PROST; RICARD; SAUMON; DREYFUSS, 2011; PINGLETON, 1988). Durante o processo de recrutamento dos alvéolos, são geradas grandes pressões intra-alveolares, a fim de proporcionar uma abertura dessas unidades que estão apresentando baixa complacência, procedimento que pode determinar uma hiperdistensão regional (LOHSER; SLINGER, 2015; TUSMAN; BOHM, 2010).

2.3.2 Aplicação de altos volumes correntes

No modo ventilatório controlado a volume (VCV) deve ser estabelecido o volume a ser ofertado em cada tempo respiratório, que é implementado como variável independente, portanto seu valor será constante, mesmo se houver alterações na resistência, complacência ou ainda no esforço feito pelo paciente durante a VM. Nessa modalidade, podem-se atingir altos níveis pressóricos de via aérea em conformidade com a elevação da resistência, utilização de esforço respiratório ou diminuição da complacência do sistema respiratório (CAMPBELL; DAVIS, 2002). Alguns estudos experimentais evidenciam que pressões e volumes acima dos valores fisiológicos podem levar ao surgimento de lesão pulmonar induzida pelo ventilador mecânico (DREYFUSS; SAUMON, 1998), bem como foi observado em estudos clínicos (VIANA; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; SARGENTELLI; PRONTOBABY HOSPITAL DA CRIANÇA *et al.*, 2004), onde volumes correntes entre 12 a 20 mL/kg (GHARIB; LILES; KLAFF; ALTEMEIER, 2009), levaram ao aumento dos níveis de

citocinas e, conseqüentemente, a uma resposta pró-inflamatória pulmonar (BAILEY; MARTIN; ZHAO; VELDHUIZEN, 2003; BROWER; MATTHAY; MORRIS; SCHOENFELD *et al.*, 2000; KIM; CHUNG; SON; KIM *et al.*, 2014; PIRES; MELO; LANZETTI; CASQUILHO *et al.*, 2012).

Por outro lado, baixos valores de volume corrente (V_c) podem levar à atelectasia, que geralmente pode ser evitado com a utilização de pressão positiva ao final da expiração (PEEP) (HAUBER; KARP; GOLDMANN; VOLLMER *et al.*, 2010; MUSCEDERE; MULLEN; GAN; SLUTSKY, 1994). No entanto, a aplicação de baixos V_t previne uma hiperdistensão, porém, não evita a abertura e o fechamento contínuo de alvéolos, que pode levar a um processo de inflamação nos pulmões (KOZIAN; SCHILLING; SCHUTZE; SENTURK *et al.*, 2011; TUCCI, 2011) ou até mesmo hipoxemia de tecido pulmonar de pacientes ou animais sob VM (PIRES; MELO; LANZETTI; CASQUILHO *et al.*, 2012).

2.3.3 A PEEP e sua importância

O objetivo da PEEP é prevenir o atelectrauma e a hiperdistensão dos alvéolos, com um menor valor possível (TUCCI, 2011) e, com isso, evitar o colapsamento das vias aéreas distais, promover a reabertura contínua alveolar e otimizar a dinâmica do volume pulmonar total. Além disso, a PEEP possibilita a redistribuição de fluido advindo do edema alveolar no espaço do interstício, melhorando o shunt (perfusão com diminuição da ventilação alveolar), e assim proporcionando um funcionamento mais interdependente e homogêneo de todo o sistema respiratório (BEITLER; MALHOTRA; THOMPSON, 2016; MALO; ALI; WOOD, 1984).

A utilização da PEEP é umas das estratégias frequentemente usada no recrutamento e estabilização dos alvéolos de pacientes com Insuficiência Respiratória Hipoxêmica (IRH), sua aplicação em situação de colapso dos alvéolos se destina a melhorar o processo de hematose, quando por consequência, ocorre elevação da Pressão Parcial de Oxigênio (PaO_2) e diminuição da Pressão Parcial de Dióxido de Carbono ($PaCO_2$). O resultado do recrutamento alveolar causado pela utilização de diferentes níveis de PEEP, também diminui o shunt dos pulmões e o efeito no espaço morto (ANDRADE; SOUZA; HORTA; PAULA COSTA *et al.*, 2018). Para pacientes que não apresentam pneumopatias, a calibração da PEEP ainda apresenta diferentes condutas, com predominância da adoção de valores mais baixos, entre 1 e 5 cm H_2O durante o intraoperatório e na Unidade de Terapia Intensiva (TUCCI, 2011). A abordagem da

PEEP na clínica se baseia nos seus efeitos benéficos como a melhoria de episódios hipoxêmicos e a redução de desvio intrapulmonar (JABBARI; ALIJANPOUR; AMRI MALEH; HEIDARI, 2013). Portanto, sabe-se que a VM com altos volumes correntes e ausência de PEEP leva a uma distensão dos brônquios e alvéolos nos indivíduos com SDRA (ROUBY; LHERM; MARTIN DE LASSALE; POETE *et al.*, 1993), bem como aumento dos níveis de citocinas observados em modelos experimentais de LPIV (HILLMAN; KEMP; NOBLE; KALLAPUR *et al.*, 2013).

Com isso, a aplicação da PEEP melhora o processo de oxigenação através da reabertura alveolar em colapso e do aumento da capacidade residual funcional (CRF), mesmo não sendo uma estratégia totalmente protetora nos casos de LPIV (ELDER; BERSTEN; SACCONI; BONDER *et al.*, 2019). Ao iniciar o seu enchimento, o pulmão demanda uma entrada energética maior do que a demanda energética armazenada na dinâmica da PEEP durante a expiração, portanto, o recrutamento diminui e com o aumento da distensão alveolar ocorre o aumento da pressão das vias aéreas. Assim, ainda que os resultados da mecânica ventilatória em relação ao atelectrauma sejam considerados protetores, a elevação da PEEP potencializa o surgimento de lesões pulmonares em pacientes ou animais sob VM (COLLINO; RAPETTI; VASQUES; MAIOLO *et al.*, 2019).

Os resultados da PEEP na dinâmica pulmonar dependem de componentes e das propriedades mecânicas do sistema respiratório. A pressão que é exercida em conjunto com o padrão da respiração, inclui a tensão expiratória e o volume obtido na expansão (FAGEVIK OLSEN; CARLSSON; OLSEN; WESTERDAHL, 2015). Portanto, uma estratégia protetora que seja capaz de limitar o dano a ser causado no pulmão precisa manter um determinado volume na expiração final que seja necessário para prevenir o colapso do alvéolo e/ ou recrutar áreas pulmonares colapsadas (SUKI; HUBMAYR, 2014).

2.4 Surfactante (composição, função e síntese)

O sistema respiratório possui uma substância capaz de prevenir o colapso durante a expiração, o surfactante, que é um líquido que reduz veementemente a tensão superficial dentro do alvéolo pulmonar, além de aumentar a complacência pulmonar, diminuindo assim o trabalho muscular durante a fase inspiratória do ciclo da ventilação

(DANIELS; ORGEIG, 2001; PERRY; DUNCKER, 1978; ZUO; VELDHUIZEN; NEUMANN; PETERSEN *et al.*, 2008).

O surfactante em humanos e animais adultos é composto por fosfolipídios, proteínas e lipídios neutros (PUNTORIERI; HIANSEN; MCCAIG; YAO *et al.*, 2013). Cerca de 10% são proteínas SP-A, SP-B, SP-C e SP-D (DANIELS; ORGEIG, 2003), sendo que SP-A e SP-D estão associadas a secreção do surfactante, e SP-B e SP-C otimizam a atividade do surfactante (MACHADO; CAMPOS; DA SILVA; DE OLIVEIRA RAMOS *et al.*, 2018). Dentre os fosfolipídios, a fosfatidilcolina é a mais expressiva (Figura 8) (ROONEY, 1984) entre a população adulta humana, com 80% de concentração, e desse valor, 74% se constitui em dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (SHELLEY; BALIS; PACIGA; ESPINOZA *et al.*, 1982), diminuindo a tensão superficial na interface ar-água em associação a SP-B, proteína que promove a interação com um fosfolipídio antioxidante denominado plasmalogênio, responsável por distribuir o DPPC. (RUDIGER; KOLLECK; PUTZ; WAUER *et al.*, 1998; SARDESAI; BINIWALE; WERTHEIMER; GARINGO *et al.*, 2017).

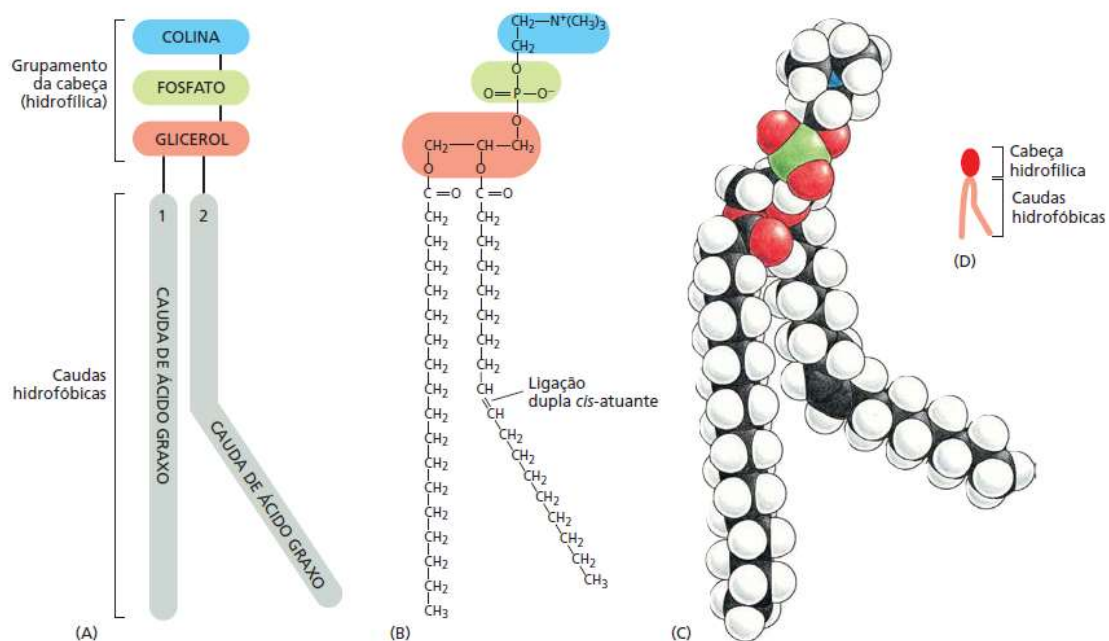


Figura 8. Molécula de Fosfatidilcolina, um dos componentes mais abundantes do surfactante pulmonar.

Fonte: adaptado de Alberts (2017)

A produção do surfactante pulmonar tem início no retículo endoplasmático (Figura 9), de onde as moléculas de proteínas são carregadas, chegando ao Complexo de Golgi (ROONEY, 1984). As proteínas SP-A e SP-D são ejetadas no meio extracelular de forma direta (HASAN; BLANKMAN; NIEMAN, 2017; WHITSETT; WEAVER, 2015), em seguida, o conteúdo surfactante é embalado em estruturas denominadas como corpos lamelares, que apresentam bicamadas de fosfolipídio e elevada taxa de fosfatidilcolinas insaturadas. Após a migração para a camada que reveste o alvéolo, esses corpos lamelares sofrem uma transição para uma estrutura única chamada de Mielina Tubular (NOTTER; SHAPIRO, 1987). Durante o ciclo ventilatório, uma parcela da mielina tubular se desarranja e é desprendida da película principal, formando vesículas, em que os pneumócitos tipo II as reabsorvem. No interior da célula, uma pequena fração sofre catabolismo, e grande parte do surfactante será absorvido junto aos corpos lamelares, que é reorganizado com lípidos e proteínas, proporcionando um mecanismo de reciclagem (ITO; VELDHUIZEN; YAO; MCCAIG *et al.*, 1997). Portanto, a reciclagem faz com que seja atenuada a necessidade de produção de surfactante, o que torna, em alguns casos, crucial a terapia de reposição com surfactante exógeno (SE), que passa a se misturar com as proteínas SP-A e SP-D, ausentes no produto comercial em situações fisiopatológicas (JOBÉ; IKEGAMI, 1993).

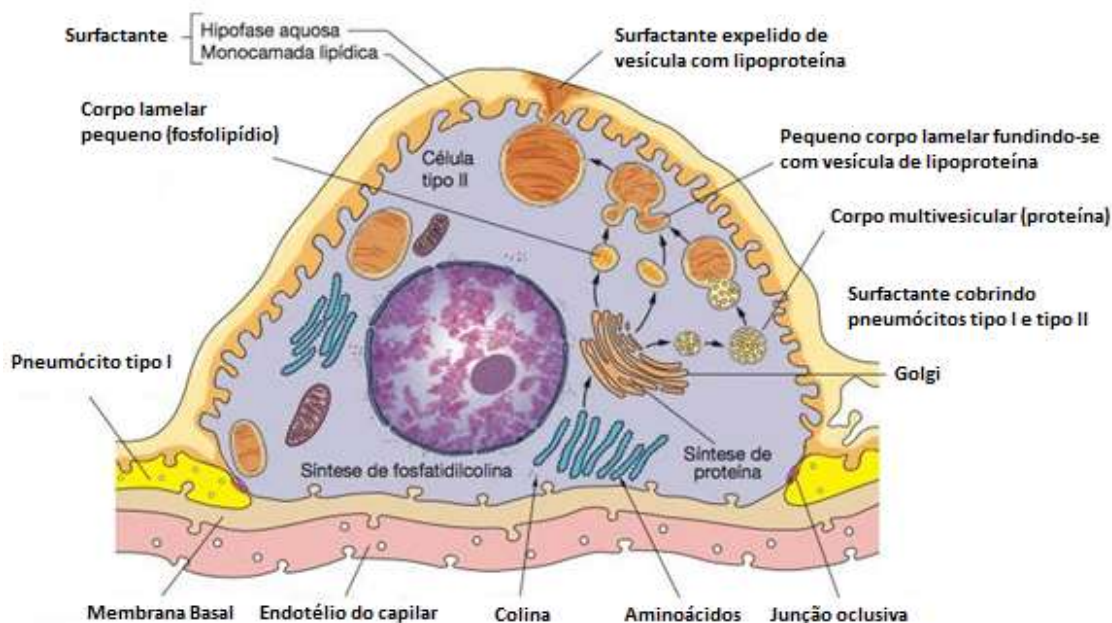


Figura 9. Pneumócito tipo II e o mecanismo de síntese do surfactante.

Fonte: adaptado de Junqueira; Carneiro (2013)

No ano de 1959, foi relatado pela primeira vez que a escassez de surfactante era uma das causas da Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) em pacientes (AVERY; MEAD, 1959). No entanto, a terapia com surfactante exógeno teve um grande progresso em 1980, quando Fugiwara realizou um estudo, em que foi feita a administração via intratraqueal de SE em prematuros com SDR, resultando em melhora efetiva na oxigenação e no quadro clínico dos pacientes (FUJIWARA; MAETA; CHIDA; MORITA *et al.*, 1980). Particularmente, os surfactantes de origem animal apresentam composições distintas quanto a fosfolipídios, proteínas de surfactante SP-A e SP-B, conteúdo plasmático, propriedades de viscosidade e o volume a ser administrado (STOCKLEY; VALOTAIRE; MILLER; DA SILVA, 2018). Em um estudo clínico utilizando o SURVANTA, surfactante de extrato bovino, foi observado entre outros parâmetros, uma redução de 21% de mortalidade, na dose de 100 mg /Kg e uma redução 50% na mortalidade, utilizando-se dose de 50 mg /Kg em pacientes com SRDA, comparados com um grupo controle. (GREGORY; STEINBERG; SPRAGG; GADEK *et al.*, 1997).

2.5 Estresse oxidativo

A primeira definição sobre o estresse oxidativo ocorreu no ano de 1985 e foi realizada por Helmut Sies (LI; JIA; TRUSH, 2016), que definiu o termo estresse oxidativo a partir da formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) quando superam o contingente neutralizador das EROs, portanto, os antioxidantes em sistemas biológicos (CAMPOS; DOURADO; DINIZ; BEZERRA *et al.*, 2014; NAGATO; BEZERRA; LANZETTI; LOPES *et al.*, 2012). O tecido pulmonar possui uma associação direta com o estresse oxidativo, pois este órgão apresenta altas pressões parciais de oxigênio em seu parênquima quando comparado com outros órgãos vitais (BÁRTHOLO 2009). Várias células de estrutura pulmonar podem produzir radicais livres de oxigênio, como por exemplo células tipo II do alvéolo, células da clara, células ciliadas presentes nas vias aéreas e macrófagos (AL-MEHDI; SHUMAN; FISHER, 1997). Dentre as EROs podemos destacar o radical hidroxila (OH^\cdot) (BUXTON; GREENSTOCK; HELMAN; ROSS, 2009), uma espécie altamente tóxica para as células, atuando na oxidação de proteínas, na peroxidação lipídica e na ruptura da estrutura de ácido desoxirribonucléico (DNA) (NAGATO; SILVA; SILVA; BEZERRA *et al.*, 2009).

Os sistemas biológicos possuem mecanismos enzimáticos de defesas contra as EROs formados pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutathione peroxidase (GPx), que não se encontram somente no citosol como também nas mitocôndrias, local onde há grande produção de radicais livres de oxigênio (JI; STRATMAN; LARDY, 1988). As enzimas protegem as células contra radicais como o superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que induzem a danos celulares (PIRES; MELO; LANZETTI; CASQUILHO *et al.*, 2012). A SOD é uma enzima de grande importância no processo de homeostase redox, seu substrato é representado pelo ânion superóxido e a sua ação é favorecida quando em meio de baixas taxas de O_2^- (MACHADO; CAMPOS; DA SILVA; DE OLIVEIRA RAMOS *et al.*, 2018). Ela representa um conjunto de enzimas que incluem superóxido dismutase de cobre (CuSOD), superóxido dismutase de zinco (ZnSOD), superóxido dismutase de manganês (MnSOD) e SOD extracelular, e têm como atribuição proteger contra as EROs, (GUNDUZ; OZTURK; SOZMEN, 2004). A SOD atua na dismutação do radical O_2^- para H_2O_2 , que é um substrato para as enzimas catalase e glutathione peroxidase (CAMPOS; MANSO; GONCALVES; SILVA *et al.*, 2013). Já a CAT, produzida e ativada no peroxissoma, transforma H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (Figura 10) (STONE; YANG, 2006).

É o sistema glutathione que age na proteção de lipoproteínas contra o estresse oxidativo e na manutenção homeostática da função pulmonar (RAHMAN, 2005). A glutathione reduzida (GSH) interage com as EROs para formação de glutathione oxidada (GSSG), que retorna a glutathione reduzida através da glutathione reductase (GRd). Dessa maneira, os níveis de estresse oxidativo e da condição redox pulmonar estão relacionados às taxas de GSH e GSSG (NAGATO; SILVA; SILVA; BEZERRA *et al.*, 2009). Alguns estudos sugerem que a funcionalidade da barreira do tecido epitelial nos alvéolos e a elevação da permeabilidade se devem à redução de níveis de GSH no epitélio pulmonar (NAGATO; BEZERRA; LANZETTI; LOPES *et al.*, 2012).

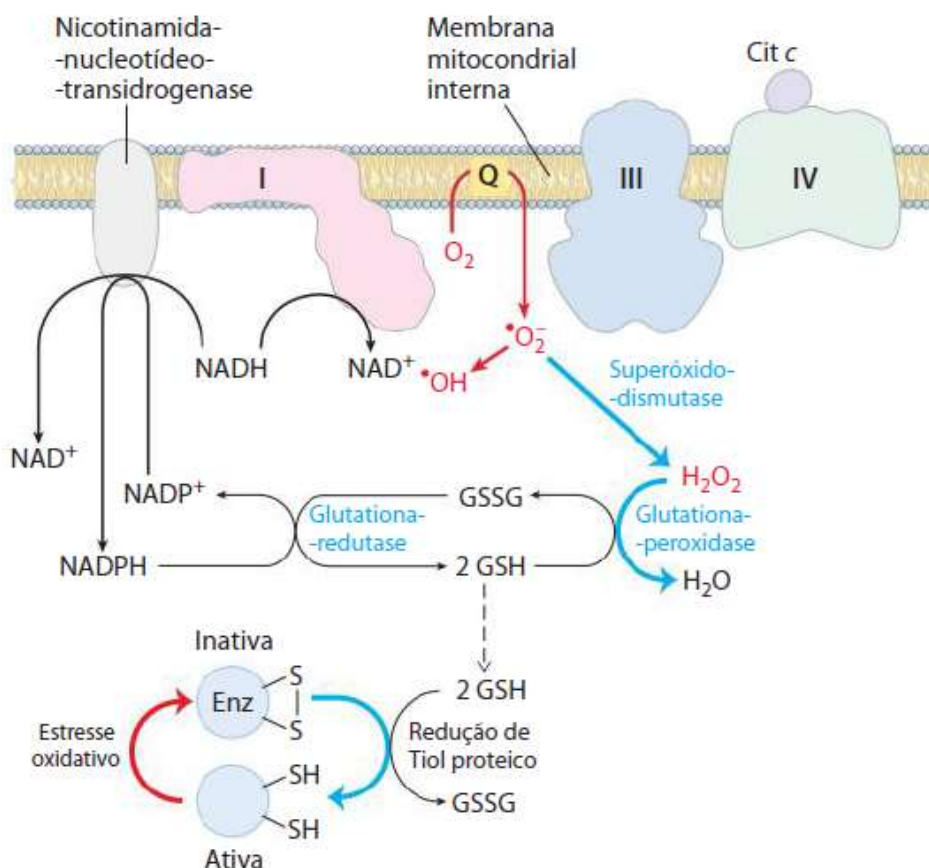


Figura 10. Mecanismo de ação das enzimas antioxidantes.

Fonte: adaptado de Nelson; Cox (2014)

O dano oxidativo mensurado pelo aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) se relaciona à disfunção no endotélio e a ventilação mecânica invasiva de longo período, pois há uma elevada formação de radicais livres a partir do oxigênio e, conseqüentemente, as lesões pulmonares e a falência de múltiplos órgãos (MAZULLO FILHO; BONA; ROSA; SILVA *et al.*, 2012).

2.6 Agentes da inflamação

O sistema respiratório possui uma defesa imunológica que envolve um mecanismo de imunidade inata, cujos componentes centrais são células fagocitárias, que compreendem os neutrófilos e macrófagos alveolares, células Natural Killer (NK) e ainda células dendríticas, e outro mecanismo de imunidade adaptativa (MOREIRA JS, 2008). A resposta de um processo de inflamação bem estabelecida demanda os estágios

de início, manutenção e resolução minuciosamente ajustadas (SWEET; CARNIELLI; GREISEN; HALLMAN *et al.*, 2017). Inicialmente, ocorre a migração de neutrófilos para onde se instalou a lesão (GROMMES; ALARD; DRECHSLER; WANTHA *et al.*, 2012), podendo haver extravasamento para a luz do alvéolo por meio de rolamento, através da ação das selectinas (LEY; LAUDANNA; CYBULSKY; NOURSHARGH, 2007). As selectinas propiciam a movimentação dos leucócitos para a superfície das células do endotélio, por meio de estímulo causado por citocinas, radicais oxidantes e outras sinalizações pró-inflamatórias (CAPELOZZI, 2011). Em seguida, há um processo de laminação e fixação ao endotélio por intermédio de integrinas e quimiocinas (BURNS; SMITH; WALKER, 2003). Em geral, os leucócitos têm a função de liberar citocinas e/ou quimiocinas que agem atraindo macrófagos, neutrófilos e linfócitos, o que conduz a grande difusão de reação inflamatória (MACHADO; CAMPOS; DA SILVA; DE OLIVEIRA RAMOS *et al.*, 2018).

Especificamente, a ventilação mecânica pode ser um viés para origem de diversos fatores que induzem inflamação e seus mediadores anti-inflamatórios, podendo causar agravamento de lesão (CROSBY; WATERS, 2010), nas estruturas alveolares, onde já foi demonstrada a liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios como TNF- α , interleucina-1 alfa (IL-1 α), interleucina-6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e interleucina 10 (IL-10) ao se adotar estratégia ventilatória com altos volumes correntes (ANDRADE; SOUZA; HORTA; PAULA COSTA *et al.*, 2018; PUGIN; DUNN; JOLLIET; TASSAUX *et al.*, 1998). A interleucina 1- beta (IL-1 β), a IL-6 e o TNF- α representam citocinas que atuam no estágio agudo e, geralmente, são liberadas logo após surgimento da lesão no pulmão (KOTECHA; CHAN; AZAM; SILVERMAN *et al.*, 1995; MATUSCHAK; LECHNER, 2010), portanto, são mediadores imprescindíveis para que haja o direcionamento da resposta, bem como cicatrização adequada (SOMMER; FLETCHER, 2015). A IL-1 é inicialmente sintetizada por macrófagos e monócitos, como por células não referentes ao sistema imunológico, os fibroblastos e células do endotélio que são ativadas no caso de inflamação (ZHANG; AN, 2007). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória glicoprotéica, secretada por diversos tipos celulares, por exemplo, macrófagos, monócitos, eosinófilos, sendo o TNF- α e a IL-1 citocinas que exercem alta indução sobre IL-6 (BHATIA, 2002; SOMMER; FLETCHER, 2015), é capaz de conduzir à ativação neutrofilica, desenvolvimento de macrófagos e especialização de linfócitos-T citotóxicos e células Natural Killer (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997). Enquanto o TNF consiste em

uma citocina que participa na ativação de leucócitos, liberando citocinas e quimiocinas e síntese das espécies reativas, sendo, portanto, muito importante para o começo, para a manutenção e evolução no processo inflamatório (MACHADO; CAMPOS; DA SILVA; DE OLIVEIRA RAMOS *et al.*, 2018).

Uma grande quantidade de quimiocinas inflamatórias se fazem presentes nos locais em que ocorrem danos e lesões, atraindo os leucócitos e se comunicando com os respectivos receptores de quimiocinas, e assim, dando início à resposta inflamatória (VIOLA; LUSTER, 2008). Essas quimiocinas são formadas por uma família extensa de pequenas citocinas, possuindo reduzido peso molecular entre 7 e 15 kDa, têm ainda efeitos quimiotáticos e agem como ativadores em subgrupos de leucócitos, que confere uma grande estimulação para conduzi-los até à região lesionada (BHATIA, 2002; RAZ; MAHABALESHWAR, 2009). Os mediadores como IL-1, TNF- α e Interferon gama, ou mesmo através de estímulos externos como lipopolissacarídeo são capazes de induzir a liberação de quimiocinas (ROSSI; ZLOTNIK, 2000). Em geral, quimiocinas pertencentes à família CC exercem estímulo nos monócitos, nos basófilos, nos eosinófilos, linfócitos-T, células Natural Killer, e a CCL2 tem efeito na quimiotaxia de monócitos (JIANG; BELLER; FRENDEL; GRAVES, 1992). A proteína inflamatória de macrófagos-1-alfa (MIP-1 α /CCL3), a proteína inflamatória de macrófagos 1-beta (MIP-1 β /CCL4) e a CCL5 atuam regulando as células T (PALOMINO; MARTI, 2015; ROLLINS; MORRISON; STILES, 1988). Apesar dos achados demonstrando as lesões pulmonares, o estresse oxidativo e a resposta inflamatória ocasionada pela VM, ainda não há consenso da utilização do tratamento com surfactante exógeno na prática clínica em pacientes adultos submetidos a VM, bem como ausência de estudos tanto em humanos quanto em animais que analisem o perfil inflamatório e o status redox pulmonar justificando a execução deste estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os possíveis efeitos da administração intranasal do surfactante exógeno no processo inflamatório e desequilíbrio redox ocasionados pela ventilação mecânica de ratos Wistar adultos saudáveis.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar a influência do surfactante exógeno de origem bovina (Survanta) na atenuação e regressão de resposta inflamatória induzida pela ventilação mecânica
- ✓ Avaliar o perfil inflamatório das células obtidas do lavado broncoalveolar;
- ✓ Mensurar os níveis de citocinas no parênquima pulmonar;
- ✓ Avaliar o estresse oxidativo no homogenato pulmonar;
- ✓ Analisar o padrão histológico do parênquima pulmonar;
- ✓ Avaliar parâmetros hemodinâmicos dos animais submetidos à ventilação mecânica;
- ✓ Analisar a mecânica ventilatória dos animais;
- ✓ Realizar ensaios bioquímicos para mensurar a oxidação de lipídeos e de proteínas pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e proteína carbonilada;
- ✓ Realizar ensaios bioquímicos para mensurar a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e o sistema glutathiona.

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 Animais

Os animais que foram utilizados receberam tratamento adequado, de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos e foram devidamente alojados no Centro de Ciência Animal (CCA), onde foram mantidos em caixas de polipropileno, contendo o número máximo de quatro animais por caixa, em ambientes em que permaneceram sob condições de iluminação no ciclo de 12 horas (claro e escuro), à temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e umidade inspecionada. Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) sob número de protocolo número 2018/06 (anexo 1).

4.2 Grupos experimentais

Para o experimento foram utilizados 32 ratos da linhagem Wistar, machos, com idade entre 8 e 9 semanas, e foram subdivididos em 4 grupos:

- Grupo controle (GC): animais que ventilaram espontaneamente durante todo o protocolo experimental;
- Grupo surfactante (GS): animais que receberam o surfactante exógeno através da instilação intranasal;
- Grupo ventilação mecânica (GVM): animais que foram ventilados artificialmente no período de 1 hora;
- Grupo ventilação mecânica + surfactante (GVMS): animais que receberam o surfactante exógeno através da instilação intranasal e foram ventilados artificialmente no período de 1 hora.

4.3 Administração do Surfactante:

O surfactante exógeno, fração fosfolipídica de pulmão bovino, Beractanto (Survanta), foi administrado por via intranasal, um volume de 500 µL, nas vias aéreas superiores (250µL em cada narina), na concentração de 25 mg/mL. Cada animal recebeu a dosagem de surfactante 1 hora antes da ventilação mecânica, de acordo com o grupo experimental. Para administração intranasal, os ratos foram anestesiados com anestesia de curta-duração de isoflurano (2%) por via inalatória, a anestesia foi realizada para garantir completa inibição dos reflexos das vias aéreas superiores fazendo com que as soluções fossem ofertadas para o pulmão (BEZERRA; RAMOS; CASTRO; ARAUJO *et al.*, 2019; MACHADO; CAMPOS; DA SILVA; DE OLIVEIRA RAMOS *et al.*, 2018).

4.4 Ventilação Espontânea

Os animais dos grupos controles, GC e GS, foram mantidos sob ventilação espontânea em ar ambiente, todavia, foram submetidos às mesmas manipulações dos outros grupos experimentais. Para registro da função pulmonar, os animais desses grupos foram previamente ambientalizados, em uma caixa hermeticamente fechada para adaptação prévia. Após isso, os animais foram colocados individualmente nesta caixa e permaneceram cerca de 8 minutos para registro dos parâmetros ventilatórios (frequência respiratória, volume corrente e volume minuto) através de pletismografia de corpo total, sendo expostos a ar sintético medicinal (21% O₂ + 79% N₂ nominal; Medipure™ Medical Gases WHITE MARTINS) com volume conhecido (1 L/min) por meio de um tubo conectado ao sistema. Para o registro, o fluxo de gases respiratórios foi detectado pelo espirômetro de mesa (AdInstruments, Dunedin, Nova Zelândia) e o sinal amplificado e analisado pelo software PowerLab.

4.5 Ventilação Mecânica

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de cetamina (80 mg/kg; Sespo Indústria e Comércio Ltda., Paulínia, SP, BR) e midazolam (5 mg/kg; União Química Farmacêutica Nacional S/A., Pouso Alegre, MG, BR) após a sedação, colocados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal, foi feito bloqueio neuromuscular via intravenosa com Cloreto de Suxametônio (1mL/kg), e foi realizada uma incisão longitudinal na região da cartilagem cricóide, onde a pele e os tecidos são

afastados com utilização de uma pinça cirúrgica para a exposição da traqueia. A seguir, foi realizado acesso à traqueia (por traqueostomia) com secção dos anéis cartilagosos, e introduzida uma cânula traqueal, estando esta, logo após, acoplada ao ventilador mecânico. Durante o procedimento os animais foram aquecidos para manter a temperatura corporal constante (37°C) e monitorizados quanto a Saturação de O₂ a cada 20 minutos. O sistema de PEEP utilizado foi o “selo d’água”, cujo mecanismo consiste de um tubo de silicone e sua extremidade faz conexão com uma proveta, onde fica armazenada a água destilada. O nível de imersão deste tubo determinou o valor da PEEP desejada (FAGEVIK OLSEN; CARLSSON; OLSEN; WESTERDAHL, 2015), no caso foi mantido a 3 cmH₂O e confirmado este ajuste no monitor do ventilador mecânico.

Os animais dos grupos GVM e GVMS foram ventilados artificialmente por meio do ventilador mecânico *Ventilator INSPIRA Advanced* (Harvard APARATUS) por um período de 60 minutos. Os dois grupos (GVM) e (GVMS) foram ventilados no modo controlado a volume, todos com fração inspirada de oxigênio (FiO₂) a 21%. Foi utilizado um volume corrente (V_T) correspondente a 12 ml/Kg e uma frequência respiratória (FR) de 80 ciclos por minuto e Pressão Positiva ao final da Expiração (PEEP) de 3 cm de H₂O.

4.6 Coleta de sangue

Após o término do protocolo experimental, foi realizada a coleta do sangue por punção cardíaca e as amostras foram analisadas no gasômetro (aparelho biomédico de análises das pressões parciais dos gases sanguíneos (Nova Biomedical, Waltham, Massa, EUA). Após o procedimento de coleta sanguínea, ocorreu a eutanásia de todos os animais realizando exsanguinação (CAMPOS; LEAL; COSTA; DE LIMA *et al.*, 2015).

4.7 Coleta do lavado broncoalveolar (LBA)

A coleta do LBA foi realizada após a eutanásia, já com o tórax aberto o pulmão esquerdo foi clampeado, a traqueia foi canulada e o pulmão direito foi lavado com 3 mL de solução salina (2 x 1500 µL). As amostras foram mantidas em gelo até o final do

procedimento a fim de evitar lise celular. Para a contagem total de leucócitos no LBA, o material coletado foi centrifugado em Centrífuga Refrigerada (Eppendorf 5415R; Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) durante 10 minutos com 3000 RPM a 4°C, após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e armazenado em freezer – 80°C. O pellet que contém os leucócitos foi ressuspensão com 100 µL de solução salina. Para corar as células foi utilizada a solução de Turk (RenyLab, Minas Gerais, BR), para isso, 180 µL de solução Turk foi adicionado em um eppendorf juntamente de 20 µL da solução ressuspensão e agitado, logo em seguida, a contagem total de leucócitos foi realizada na câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial de células no LBA, 40 µL das amostras foram centrifugadas em uma Cito-centrífuga (INBRAS equipamentos para saúde, SP, BR) com uma rotação de 1.000 RPM durante 1 minuto. Após a obtenção das lâminas, essas foram coradas com o Kit Rápido de Corantes para uso Hematológico (RenyLab, Minas Gerais, BR), através de banhos de imersão de 40 segundos em cada uma das três soluções distintas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de corantes e secadas em temperatura ambiente. Após secagem foram contadas 100 células por lâmina e diferenciadas em: macrófagos, linfócitos e neutrófilos em microscópio óptico com óleo de imersão com aumento de 100x (CAMPOS; ARAUJO; MARTINS; BANDEIRA *et al.*, 2017; PENA; RAMOS CDE; SOARES; DA SILVA *et al.*, 2016). A técnica de contagem diferencial foi realizada duas vezes por dois patologistas diferentes.

4.8 Coleta dos pulmões para análises histológicas

O pulmão direito foi clampeado, propiciando a perfusão do pulmão esquerdo com solução de formalina tamponada a 4% com pH de 7,2 e pressão de 25 cmH₂O pelo tempo de 2 minutos via traqueal e, em seguida, imerso em solução fixadora por 48h. A seguir, foi feito banho sob água corrente, por 30 minutos, banho em álcool 70% e 90% com duração de 30 minutos em cada concentração, depois feito 2 banhos em álcool 100% também por 30 minutos cada e incluídos em parafina a seguir. Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia para obtenção de cortes seriados com 4 µm e foram corados em hematoxilina–eosina (H&E) (CAMPOS; LEAL; COSTA; DE LIMA *et al.*, 2015; PENA; RAMOS CDE; SOARES; DA SILVA *et al.*, 2016).

4.9 Análises Estereológicas do parênquima pulmonar

Para a realização da estereologia, as lâminas coradas em H&E foram fotografadas utilizando o microscópio de luz Primo Star (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha), esse microscópio possui uma câmera digital (Axiocam 105) que é acoplada ao software de captação de imagens (ZEN lite image). Para realizar as análises de densidade de volume dos septos alveolares (V_v [sa]) e dos espaços alveolares (V_v [a]) cada lâmina foi fotografada em 20 campos a um aumento de 40 vezes, cada campo foi avaliado utilizando um sistema de teste composto de 16 pontos e uma área de teste conhecida onde uma linha proibida era considerada como delimitação, a fim de evitar a superestimação do número de estruturas (BEZERRA; RAMOS; CASTRO; ARAUJO *et al.*, 2019; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

4.10 Homogenato pulmonar

Para a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes, do dano oxidativo e dos marcadores inflamatórios foi utilizado 100 mg do tecido pulmonar. Esses foram pesados separadamente e colocados em tubo de polipropileno contendo 1 mL de tampão fosfato com de pH 7,8 e, então, feita a homogeneização de tecidos (Homogeneizador Nova Técnica mod. NT136, Piracicaba, Brasil). A seguir, as amostras foram submetidas à centrifugação por um tempo de 10 minutos e 13000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e conservado em freezer à temperatura de -80°C (CAMPOS; ARAUJO; MARTINS; BANDEIRA *et al.*, 2017).

4.11 Biomarcadores do Estresse Oxidativo

4.11.1 Proteínas Totais

O método de Bradford foi para as dosagens das proteínas totais as amostras de homogenato de tecido pulmonar (BRADFORD, 1976). O reagente é composto por corante Comassie brilhante blue, que em meio a solução ácida, se liga às proteínas da amostra, elevando o valor de absorvância, de 465 nm para 595 nm. Uma curva padrão foi determinada através de concentrações crescentes de proteína albumina para esta avaliação, e 0,01g de albumina sofreu processo de dissolução em 1000 μL de água Mili-Q, e, dessa solução, foi usado 200 μL para ser adicionado a 3,8 mL de água Mili-Q, totalizando um volume de 4 mL de solução para a concentração de 0,5 mg / mL. Os

pontos da curva sofrem variação entre 0,5 mg/ mL até 0,05 mg/ mL, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Curva padrão de albumina

Diluição de albumina	Albumina 0,01 g/mL	Água Mili-Q
0,5 mg/mL	1000 µL	--
0,4 mg/mL	800 µL	200 µL
0,3 mg/mL	600 µL	400 µL
0,2 mg/mL	400 µL	600 µL
0,1 mg/mL	200 µL	800 µL
0,05 mg/mL	100 µL	900 µL

A diluição foi feita em água Mili-Q de solução de Comassie blue, em proporção de 4:1 de água Mili-Q para solução Comassie blue. Uma vez a curva padrão pronta e a diluição da mesma, foram adicionados a cada poço correspondente 2 µL de amostra do homogenato pulmonar, que foi diluído em 8 µL de água Mili-Q. A seguir, 190 µL de solução Comassie blue diluída, foi então pipetada e dispensada em todos os poços da placa. Essa foi encubada a temperatura ambiente durante 30 minutos e a leitura foi feita em espectrofotômetro de placas a 595 nm (CAMPOS; ARAUJO; MARTINS; BANDEIRA *et al.*, 2017).

4.11.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD, foi avaliada no homogeneizado tecidual conforme descrito pelo método descrito por Marklund e Marklund (MARKLUND; MARKLUND, 1974), que é baseado em verificar o quanto a SOD é capaz de inibir a auto-oxidação do pirogalol. Os reagentes usados foram: fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), Pirogalol e MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difenilterazolio) e dimetilsulfóxido (DMSO). Para a realização da dosagem, foi usada uma alíquota de sobrenadante, onde o sobrenadante foi pipetado em placa de 96 poços. Em seguida, houve à adição dos reagentes como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Reagentes utilizados para a análise da atividade da Superóxido Dismutase

	Amostra	Tampão	MTT (1,25 Mm)	Pirogalol (100µM)
Branco	-	144µl	6 µl	-
Padrão	-	129µl	6µl	15µl
Amostra	30µl	99 µl	6µl	15µl

A placa foi incubada durante 5 minutos a temperatura de 37 °C e, em seguida, 150 µL de DMSO foram adicionados para ser feito o preparo da reação. A placa foi então lida em espectrofotômetro de placa a 570 nm, e, posteriormente, ao valor de absorbância foi feita uma conversão de unidade de SOD por meio de subtração do valor da absorbância da amostra pelo valor do branco. O resultado obtido foi demonstrado em U/mg de proteína (CAMPOS; ARAUJO; MARTINS; BANDEIRA *et al.*, 2017).

4.11.3 Atividade da catalase

A descrição da mensuração da atividade de catalase foi feita de acordo com (AEBI, 1984) por meio de decréscimo do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a um valor de absorbância de 240 nm. O método é baseado na decomposição de enzima do H₂O₂ em período de 60 segundos através de espectrofotometria. Foi utilizada uma alíquota do sobrenadante, como amostra biológica.

Para a preparação do tampão fosfato, foram usados os reagentes seguintes: cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) e fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄). Os sais que sofreram diluição e a água destilada foram conservados na geladeira. Foi usado 25 mL de tampão, misturados em seguida a 40 µL de peróxido de hidrogênio. Após esta preparação dos reagentes, foi feita a leitura em espectrofotômetro. O tampão junto ao peróxido foi coletado com cada amostra separadamente em uma cubeta de quartzo com volumes de 970 µL e 30 µL respectivamente, para serem registrados a 240 nm por um período de 60 segundos, e feita anotação a cada 10 segundos. A detecção da atividade da catalase foi demonstrada pela diminuição do valor de absorbância a 240 nm, concordando com a Lei de Lambert Beer, em que 1 U tem a equivalência de 1 µmoL de hidrólise de H₂O₂ / minuto/ mL (CAMPOS; ARAUJO; MARTINS; BANDEIRA *et al.*, 2017).

4.11.4 Sistema Glutationa

A dosagem da glutatona total foi feita a partir da adaptação do kit comercial Sigma #CS0260, que faz uso de uma metodologia cinética para avaliar os níveis de glutatona total (GSH + GSSH) em amostras biológicas por meio de redução do ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) a TNB. Para a realização desta avaliação, foi homogeneizado 50 mg de pulmão com 500 μ L de ácido sulfossalicílico a 5% (SSA), posteriormente, as amostras foram levadas à centrifugação em 10000 rpm pelo tempo de 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi colhido e utilizado como amostra biológica, e a dosagem foi feita em placa de 96 poços. A curva padrão da análise foi feita utilizando 3 mg de glutatona reduzida que sofreu diluição em 1 mL de água destilada para, a partir dessa solução deixada em estoque, serem preparados os pontos de curva, como podemos observar na Tabela 3.

Tabela 3. Curva padrão para análise de glutatona total

Ponto da curva	1	2	3	4	5
Concentração de GSH (μ M)	50	25	12,5	6,25	3,125
Solução de GSH (μ L)	50	25 (Tubo 1)	25 (Tubo 2)	25 (Tubo 3)	25 (Tubo 4)
SSA 5% (μ L)	-	25	25	25	25
nmoles de GSH em 10 μ L de amostra	0,5	0,25	0,125	0,062	0,0312

Foram pipetados 10 μ L de solução de curva em cada poço da placa, e, 10 μ L das amostras para teste ou 10 μ L de SSA a 5% para o branco, como demonstrado na Tabela 4, em seguida, adicionou a mistura contendo o tampão fosfato de potássio, glutatona redutase e DTNB. As amostras foram incubadas por 5 minutos e, em seguida, a reação foi iniciada com a adição de 50 μ L de solução de NADPH. Com o início da reação, a absorbância foi imediatamente medida a 405 nm utilizando um espectrofotômetro de placa. Foram realizadas 5 leituras com intervalo de 1 minuto entre cada leitura.

Tabela 4. Reagentes para a análise de Glutaciona

	Amostra (μL)	SSA 5% (μL)	Mistura de trabalho (μL)	NADPH (μL) de uso
Branco	-	10	150	50
Curva Padrão (5 pontos)	10	-	150	50
Amostra	10	-	150	50

Para realizar a mensuração dos níveis de glutaciona oxidada, a curva padrão e os reagentes foram coletados em pipeta na placa de 96 poços, mas, neste caso as amostras biológicas foram conduzidas a um processo de derivatização antes de iniciar a dosagem. Foram feitas alíquotas de 100 μL das amostras e a elas foi acrescentado 2 μL de vinilpiridina e 5 μL de trietanolamina (TEA), contendo o nível de pH entre 6 e 7, e então, as amostras passaram por incubação a temperatura ambiente durante uma hora. A seguir, foi usado 10 μL desta amostra obtida para sofrer reação com a mistura. As concentrações de glutaciona total e oxidada foram obtidas através da curva padrão preparada em cada dosagem. Para encontrar a concentração de glutaciona reduzida nas amostras foi subtraído o valor de glutaciona oxidada do valor de concentração da glutaciona total. Obteve-se a relação GSH/GSSG através da divisão dos resultados de concentração de GSH pelos resultados de GSSG (BANDEIRA; DA SILVA; ROSSONI; FIGUEIREDO *et al.*, 2017; MURTA; CAMPOS; BANDEIRA; DINIZ *et al.*, 2016)

4.11.5 Análise do Dano Oxidativo - TBARS

A análise da peroxidação lipídica foi feita análise em conformidade com a metodologia de Buege (BUEGE; AUST, 1978). O ácido tiobarbitúrico (TBA) faz reação com lipídios oxidados, resultando em malondialdeído. Para ser feita a análise, foi utilizado 500 μL do homogeneizado tecidual, 250 μL de solução de tricloroacético (TCA 28% p/v dissolvido em ácido clorídrico), 250 μL de TBA 1% dissolvido em ácido acético 1:1 e 125 μL de butil hidróxitolueno (BHT) 5 mM dissolvido em álcool foram todos acrescentados. O tubo foi direcionado ao vórtex e submetido a banho-maria a

95°C durante 15 minutos, para serem a seguir resfriadas em gelo durante 5 minutos e, em seguida, o material foi levado à centrifugação pelo tempo de 10 minutos e 13000 rpm. Foi feita a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro a 535 nm. A determinação da taxa de TBARS concentrada foi revelada, usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), de acordo com a lei de *Lambert Beer*. O resultado foi determinado em nmols/ mL (SOARES; CAMPOS; PENA; BANDEIRA *et al.*, 2016).

4.11.6 Dosagem da proteína carbonilada

O processo de oxidação de proteínas pelas espécies reativas de oxigênio conduz à síntese de derivados carbonílicos, eles podem ser medidos através de métodos sensíveis, como aqueles que usam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), que faz reação com grupos carbonílicos, resultando em hidrazona, que foi analisada por espectrofotômetro.

A avaliação da proteína carbonilada ocorreu através do protocolo adaptado da metodologia de Reznick (REZNICK; PACKER, 1994). Para isso, foi usado 500 μL de homogeneizado pulmonar, que foi dispensado em tubos de polipropileno e acrescentado 500 μL de TCA 10%, misturou-se no vórtex e, então, submeteu-se centrifugação durante 3 minutos a 5000 RPM. O sobrenadante foi descartado se adicionou ao precipitado 500 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), feito isso as amostras foram conservadas em temperatura ambiente no escuro, durante 60 minutos e a cada 5 minutos, as amostras eram levadas ao vórtex, para serem misturadas. Ao fim do processo, foi adicionado 500 μL de TCA para as amostras serem levadas à centrifugação durante 3 minutos a 5000 RPM. O sobrenadante foi descartado, 1 mL do composto de etanol/acetado de etila (1:1) foi acrescentado nos tubos, misturados no vórtex, para então serem centrifugados. Esta etapa da reação foi repetida duas vezes. Posterior à lavagem de solução de etanol /acetato de etila pela segunda vez, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 1 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%, em seguida, misturado no vórtex centrifugado a 10000 RPM durante 3 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes tiveram sua leitura feita no espectrofotômetro a 370 nm. A obtenção da concentração de proteína carbonilada foi feita conforme a equação de Lambert Beer a seguir:

$$C = \frac{Abs}{\varepsilon} \times \frac{1 \times 10^6}{VA}$$

- Abs = Absorbância
- ε = coeficiente de extinção molar em unidades de 22000 M.L-1 cm-1;
- VA = volume da amostra;
- C = concentração de proteína carbonilada na amostra (nmol/mL).

Para a determinação da concentração de proteína carbonilada em relação à concentração de proteínas totais utilizou-se o valor encontrado na análise de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), cuja equação é:

$$\text{Equação: } \frac{\text{Proteína carbonilada da amostra (nmol/mL)}}{\text{Proteína total da amostra (mg/mL)}}$$

4.12 Ensaios Imunoenzimáticos do Parênquima Pulmonar

Foram analisados a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos 1 (CCL2), proteína inflamatória de macrófago 1-alfa (CCL3), CCL5 (do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), fator de necrose tumoral (TNF), no tecido homogeneizado pulmonar misturado com 1 mL de tampão fosfato. Para a realização das análises de tecido pulmonar foram usados 100 mg de tecido homogeneizado com 1 mL de tampão fosfato. As amostras foram levadas à centrifugação a 4°C, foi feito congelamento do sobrenadante a -20° C, e, posteriormente, levadas para serem analisadas através do método Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay (ELISA). Esses ensaios foram realizados utilizando kits e todos os anticorpos e os reagentes foram reconstituídos e aliquotados de acordo com as orientações dos fabricantes. As análises foram realizadas como descrito a seguir.

Em resumo, em placas de 96 poços foram adicionados 100 µL de anticorpo monoclonal contra o peptídeo (anticorpo de captura), reconstituído em PBS, sendo estas placas incubadas por 12 horas, a temperatura ambiente. Os anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS-Tween (PBS adicionado de 0,05% de Tween20) e as placas foram bloqueadas com 100 µL/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a temperatura

ambiente. A seguir, as placas foram novamente lavadas. Foi preparada por diluição seriada uma curva padrão. As amostras foram aplicadas em um volume de 25 μL para cada poço e, a seguir, foi realizada incubação por 2 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários (anticorpo de detecção), após os poços serem devidamente lavados, foram diluídos em PBS-BSA 0,1% e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada e 100 μL de estreptoavidina ligada à peroxidase (na diluição recomendada pelo protocolo de cada kit) em PBS-BSA 0.1% foram adicionados à placa e a mesma incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. O cromógeno escolhido para revelação foi a Tetrametilbenzidina (Color Reagent B - R&D Systems, Minneapolis, USA). 5 mL do cromógeno foi adicionado a 5 mL de peróxido de hidrogênio (Color reagent A - R&D Systems, Minneapolis, USA). 100 μL dessa solução foram adicionados em cada um dos poços e, após vinte minutos de incubação em ausência de luz e temperatura ambiente, a reação foi bloqueada adicionando-se 100 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2,5 M por poço. A leitura da intensidade de coloração foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm, imediatamente após a adição de H_2SO_4 para o bloqueio das reações. A quantificação das quimiocinas e interleucinas presentes nas amostras foi determinada baseada na densidade óptica obtida com a curva padrão dos peptídeos, analisadas pelo software SOFT Max PRO 4.0 (PENITENTE; LEITE; DE PAULA COSTA; SHRESTHA *et al.*, 2015).

4.13 Análises estatísticas

A distribuição paramétrica dos dados foi avaliada utilizando o teste de normalidade Kolmogorov –Smirnov. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Para os dados com distribuição normal foi utilizada a análise de variância univariada (ANOVA one-way) seguido pelo pós-teste de Tukey. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns. Em ambos os casos, a diferença significativa foi considerada quando o valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows 7, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da gasometria arterial e da função pulmonar

Ao término do protocolo experimental foram realizados a gasometria arterial para possibilitar a análise dos gases séricos e durante o protocolo, análise dos parâmetros respiratórios tais como frequência respiratória, volume corrente e volume minuto, nos grupos experimentais. Os valores foram apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Análise de gases sanguíneos e função pulmonar em ratos wistar

	GC	GS	GVM	GVMS
pH	7,39 ± 0,017	7,39 ± 0,015	7,53 ± 0,012 ^{a,b}	7,51 ± 0,020 ^{a,b}
pO₂(mmHg)	80,54 ± 4,17	70,76 ± 4,27	136,3 ± 3,07 ^{a,b}	135,5 ± 3,31 ^{a,b}
pCO₂ (mmHg)	35,62 ± 2,71	34,44 ± 1,21	12,88 ± 0,96 ^{a,b}	14,10 ± 1,33 ^{a,b}
HCO₃(mmol/L)	21,94 ± 1,27	21,66 ± 0,53	11,08 ± 0,66 ^{a,b}	11,40 ± 0,58 ^{a,b}
SO₂ (%)	92 (74/96,20)	89 (84/97)	99 (99-100) ^{a,b}	99 (99-99) ^b
VT (mL)	1,97 ± 0,31	1,92 ± 0,45	5,52 ± 0,09 ^{a,b}	4,92 ± 0,20 ^{a,b}
VM (mL/min)	194,4 ± 45,11	197,8 ± 50,57	442,1 ± 7,42 ^{a,b}	393,7 ± 16,24 ^{a,b}

GC: grupo controle; GS: Grupo de instilação intranasal de surfactante; GVM: grupo de ventilação mecânica; GVMS: grupo ventilação mecânica + instilação intranasal de surfactante. SO₂: saturação de oxigênio; pO₂: pressão parcial de oxigênio; pCO₂: pressão parcial de dióxido de carbono; HCO₃: bicarbonato; FiO₂: fração inspirada de oxigênio. (a) representa uma diferença significativa em relação ao GC. (b) representa uma diferença significativa em relação ao GS. (c) representa uma diferença significativa em relação ao GVM. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média, para a análise estatística da Variância One Way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey (p < 0,05). Os resultados também expressos em mediana (valor mínimo / máximo), para a análise estatística, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn's = 5 a 6 animais por grupo.

De acordo com a Tabela 5, pode-se observar um aumento de pH e de pO₂ nos grupos submetidos a VM, GVM e GVMS, em relação aos grupos controles, GC e GS. Esse mesmo resultado é percebido na relação pO₂/FiO₂, já que a FiO₂ era uma variável fixa no experimento (21%). Em relação a pCO₂ e os níveis de bicarbonato (HCO₃⁻),

foram menores em GVM e GVMS comparado aos grupos GC e GS. Observamos ainda que a saturação de oxigênio (SpO_2) foi maior em GVM em relação aos grupos GC e GS, e maior em GVMS em relação ao grupo GS.

Em relação a função pulmonar foi observado nos grupos submetidos a VM, GVM e GVMS, valores maiores para o volume corrente (V_T) e o volume-minuto (VM) em comparação aos grupos GC e GS.

5.2 Análise do influxo de células no lavado broncoalveolar (LBA)

A presença de células inflamatórias foi avaliada através da contagem total e diferencial de células no LBA (Figura 11). Os resultados encontrados demonstraram que houve um aumento de leucócitos totais no LBA no GVM comparados ao GC e GS. Ao realizar a avaliação das contagens diferenciais de leucócitos: macrófagos, linfócitos e neutrófilos também foram observados que houve maior recrutamento de todos estes subtipos celulares para o LBA no GVM comparado ao GC e GS, e de modo interessante houve diminuição desses influxos em GVMS em comparação ao GVM.

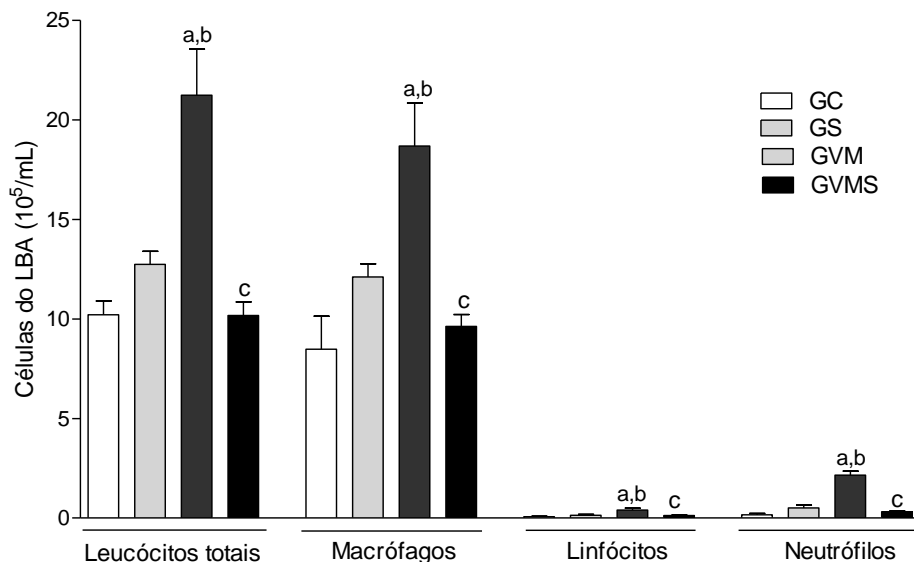


Figura 11. Célula inflamatória no lavado broncoalveolar.

GC: grupo controle; GS: Grupo de instilação intranasal de surfactante; GVM: grupo de ventilação mecânica; GVMS: grupo ventilação mecânica + instilação intranasal de surfactante. (a) representa uma diferença significativa em relação ao GC. (b) representa uma diferença significativa em relação ao GS. (c) representa uma diferença significativa em relação ao GVM. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média.

Análise de Variância One Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), $n = 5$ a 6 animais por grupo.

5.3 Biomarcadores do Estresse oxidativo

Os biomarcadores do estresse oxidativo no parênquima pulmonar avaliados podem ser vistos na Tabela 6. Inicialmente, foi observado que as atividades das enzimas SOD e CAT estavam aumentadas em GVM quando comparado a GC e GS, e houve redução em GVMS comparado a GVM. Em relação a razão de GSH/GSSG, houve redução em GVM comparado ao GC. Quanto à formação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), os resultados mostraram que a peroxidação lipídica foi maior em GVM quando comparado a GC e GS, e a administração intranasal do surfactante exógeno antes da submissão à VM promoveu uma melhora deste parâmetro sendo observado menor dano oxidativo em GVMS quando comparado ao GVM. Além disso, foi observada uma menor oxidação de proteínas avaliada pela proteína carbonilada no GVMS comparado ao GVM.

Tabela 6. Biomarcadores do estresse oxidativo no parênquima pulmonar de animais

	GC	GS	GVM	GVMS
SOD (U/mg proteína)	15,35 ± 1,95	17,74 ± 3,19	34,61 ± 3,24 ^{a,b}	14,58 ± 1,76 ^c
CAT (U/mg proteína)	1,42 ± 0,24	1,49 ± 0,18	2,91 ± 3,87 ^{a,b}	1,91 ± 0,12 ^c
Relação GSH/GSSG	2,60 (1,72/4,66)	1,53 (0,67/7,83)	0,84 (0,29/0,86) ^a	1,74 (1,49/2,27)
TBARS (nmol/mg proteína)	0,75 ± 0,07	0,72 ± 0,08	1,13 ± 0,13 ^{a,b}	0,71 ± 0,05 ^c
Proteína carbonilada (nmol/mg proteína)	4,52 ± 0,82	4,28 ± 0,86	8,94 ± 0,86 ^{a,b}	3,59 ± 0,48 ^c

GC: grupo controle; GS: Grupo de instilação intranasal de surfactante; GVM: grupo de ventilação mecânica; GVMS: grupo ventilação mecânica + instilação intranasal de surfactante. (a) representa uma diferença significativa em relação ao GC. (b) representa uma diferença significativa em relação ao GS. (c) representa uma diferença significativa em relação ao GVM. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média, para a análise estatística da Variância One Way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados também expressos em mediana (valor mínimo / máximo), para a

análise estatística, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn's. n = 4 a 5 animais por grupo.

5.4 Análises Imunoenzimáticas

As análises dos níveis de biomarcadores inflamatórios CCL2, CCL3, CCL5, e IL-1, IL-6 e TNF foram realizados no homogeneizado pulmonar e demonstrados na Tabela 7. Em relação a CCL5, não houve diferença entre os níveis nos 4 grupos analisados. Já com relação a CCL3, observou-se um aumento nos níveis apenas em GVM em relação à GC. Quanto à CCL2, IL-1, IL-6 e TNF observou-se um aumento em GVM comparado ao GC e GS e a administração do surfactante foi capaz de promover uma redução nos níveis dessas citocinas pró-inflamatórias, ou seja, houve uma diminuição em GVMS quando comparado à GVM.

De acordo com os dados da tabela 7, os resultados denotam que a concentração de CCL2 foi maior no GVM em relação aos grupos GC e GS, e que houve uma diminuição de concentração de CCL2 no GVMS quando comparado ao grupo GVM; também se observa concentração de CCL3 maior no GVM em relação ao grupo GC; e ainda um número de concentrado maior de IL-1 e IL-6 no GVM ao se comparar com os grupos GC e GS, como também há uma concentração menor de IL-1 e IL-6 presentes no GVMS em relação ao GVM. Em relação ao TNF- α , observa-se um aumento no GVM em relação a GC e GS, bem como, uma diminuição no GVMS em relação a GVM.

Tabela 7. Marcadores Inflamatórios no Parênquima Pulmonar

	GC	GS	GVM	GVMS
CCL2 (pg/mL)	1216 \pm 32,39	1257 \pm 43,05	1599 \pm 75,19 ^{a,b}	1317 \pm 62,72 ^c
CCL3 (pg/mL)	189,4 \pm 4,45	215.8 \pm 13,47	242.0 \pm 12,67 ^a	207.2 \pm 5,88
CCL5 (pg/mL)	390,9 \pm 39,01	568.1 \pm 92,03	474.3 \pm 44,18	518.1 \pm 58,28
IL-1 (pg/mL)	528,4 \pm 4,03	580.7 \pm 110,3	1400 \pm 200,1 ^{a,b}	687.7 \pm 105,6 ^c
IL-6 (pg/mL)	1553 \pm 33,59	2131 \pm 100,6	1654 \pm 102,7 ^{a,b}	1507 \pm 60,82 ^c
TNF-α(pg/mL)	1222 \pm 36,49	1603 \pm 39,91	1310 \pm 58,90 ^{a,b}	1221 \pm 35,53 ^c

GC: grupo controle; GS: Grupo de instilação intranasal de surfactante; GVM: grupo de ventilação mecânica; GVMS: grupo ventilação mecânica + instilação intranasal de surfactante. CCL2 ou MCP1: proteína quimiotática de monócitos 1; CCL3 ou MIP-1 α : proteína 1-alfa inflamatória de macrófagos; CCL5 ou RANTES; IL-1: interleucina 1; IL-6: interleucina-6; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa. (a) representa uma diferença

significativa em relação ao GC. (b) representa uma diferença significativa em relação ao GS. (c) representa uma diferença significativa em relação ao GVM. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Análise de Variância One Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), $n = 5$ a 6 animais por grupo.

5.5 Estereologia

Por último, foram feitas análises estereológicas do parênquima pulmonar dos grupos experimentais que mostraram que a ventilação mecânica com alto volume corrente promoveu dano ao parênquima pulmonar. Conforme apresentado na Figura 12, os animais que foram ventilados a 12 mL/kg (GVM) tiveram um aumento na densidade do espaço aéreo alveolar ($V_v[a]$) e, conseqüentemente, uma redução na densidade de septos alveolares ($V_v[sa]$), quando comparado ao GC e GS. Surpreendentemente, a administração via intranasal com surfactante protegeu o parênquima pulmonar, ou seja, foi demonstrado uma diminuição significativa em $V_v[a]$ e aumento em $V_v[sa]$ ambos comparados ao GVM.

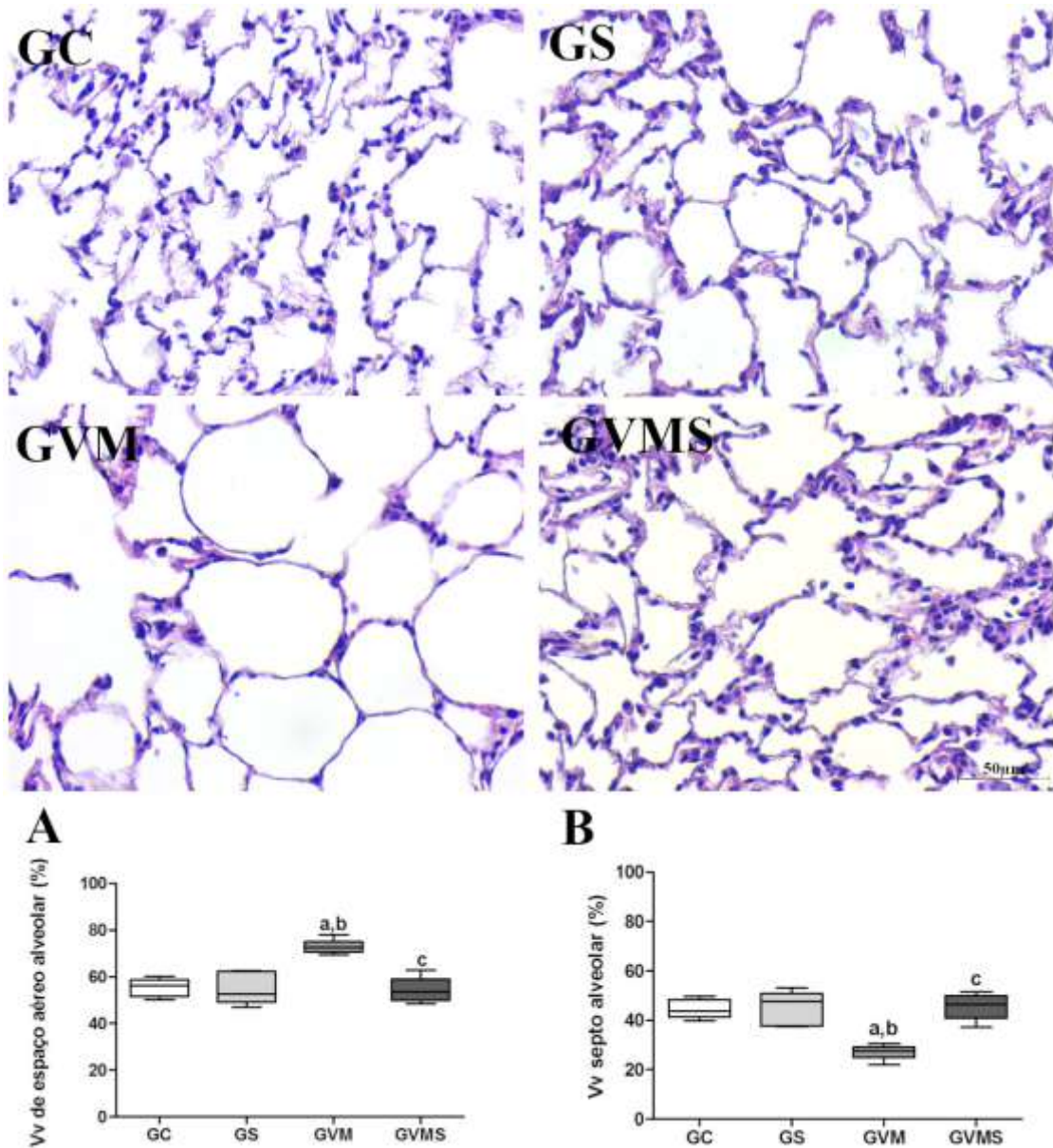


Figura 12. Análises estereológicas das secções pulmonares.

GC: grupo controle; GS: Grupo de instilação intranasal de surfactante; GVM: grupo de ventilação mecânica; GVMS: grupo ventilação mecânica + instilação intranasal de surfactante. (A) Densidade de volume do espaço aéreo alveolar. (B) Densidade volumétrica dos septos alveolares. Para os dados A e B foram expressos em mediana, valor mínimo e máximo e analisados por Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, n = 5 a 6 animais por grupo. (C) Fotomicrografias de secções pulmonares coradas com hematoxilina e eosina. Barra = 50 μ m, aumento de 400x.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo experimental, avaliamos os possíveis efeitos da administração intranasal de surfactante de origem bovina no processo inflamatório e status redox ocasionados pela ventilação mecânica utilizando alto volume corrente (12 mL/kg) em ratos Wistar adultos saudáveis. Apesar da ventilação mecânica ser um procedimento de grande importância ofertado a pacientes que se encontram com necessidade de suporte respiratório, a VM também apresenta repercussões negativas (FREITAS; SILVA; TAVARES; BARROSO *et al.*, 2009; NAKAMURA; MALLOY; MCCAIG; YAO *et al.*, 2001; PUNTORIERI; HIANSEN; MCCAIG; YAO *et al.*, 2013), tais como a lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica (LPIV) que tem sido correlacionada ao aumento da mortalidade em adultos, sobretudo em indivíduos acometidos de síndrome da angústia respiratória (DAVIDOVICH; DIPAOLO; LAWRENCE; CHHOUR *et al.*, 2013). Portanto, existe a necessidade de acompanhamento contínuo do quadro clínico do paciente submetido a VM e, se tratando de suporte ventilatório, um dos parâmetros necessários para se monitorizar é a análise dos gases arteriais através da gasometria avaliando o estado ácido-base do organismo, feito principalmente através de quatro parâmetros determinados em amostras de sangue arterial, sendo eles: valores de potencial Hidrogeniônico (pH) sanguíneo, da pressão parcial de gás carbônico (PaCO₂) e oxigênio (PaO₂), íon Bicarbonato (HCO₃⁻) e saturação da Oxi-hemoglobina, bem como parâmetros relacionados a função pulmonar tais como o volume corrente e o volume minuto.

No presente estudo, foi observado que os animais submetidos a VM com alto volume corrente houve uma elevação do pH e pO₂ e uma redução de pCO₂ e HCO₃⁻ quando comparado aos animais em ventilação espontânea, sugere-se que o aumento do pH esteja correlacionado a redução de pCO₂, e a pO₂ aumentou em função da hiperventilação em consequência do alto volume corrente, caracterizando uma alcalose respiratória. Sabe-se também que os níveis de PaCO₂ está vinculado à ventilação, e um quadro de hipocapnia se desenvolve quando há hiperventilação (ULTRA, 2009). No organismo, quando ocorre variação em PaCO₂ o ajuste se dá através do Sistema Nervoso Central e Respiratório, com o tamponamento feito pelo sistema bicarbonato, que é ajustado pela função renal, e o pH arterial, cujo cálculo para obtenção do mesmo é: $\text{pH} = \text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, realizando a liberação ou ainda a retenção de acidez ou de alcalinidade para o equilíbrio (GAMBAROTO, 2006). Em nosso estudo, nos animais

submetidos a VM, os mecanismos compensatórios estão acionados, uma vez que houve alterações nos valores de HCO_3^- , pH e pCO_2 em resposta a hiperventilação. Outro fator importante a ser avaliado é a função pulmonar, uma vez que a estratégia de utilização de altos volumes correntes em pacientes com lesão pulmonar aguda potencializa a disfunção das atividades pulmonares, os grupos sob VM tiveram seus volumes correntes e frequência respiratória ajustados no equipamento, portanto, também houve um aumento no volume minuto destes animais comparado aos animais sob ventilação espontânea.

A adoção de uma estratégia ventilatória com alto volume corrente somado a PEEP que introduz uma resistência ao estágio expiratório do paciente, proporciona um aumento de oxigenação arterial e otimiza a complacência nos pulmões, o que terá como principais resultados, uma elevação da capacidade residual funcional (CRF), uma dinâmica variada de pressão intra-alveolar e shunt pulmonar mais ameno (FREITAS; SILVA; TAVARES; BARROSO *et al.*, 2009), no entanto, esta estratégia irá conduzir a lesões induzidas pelo ventilador, e embora os mecanismos não sejam totalmente elucidados, a infiltração neutrofílica é uma característica marcante (OECKLER; HUBMAYR, 2007) e, uma variedade de mediadores inflamatórios e processos estão associados a essa lesão (JAECKLIN; ENGELBERTS; OTULAKOWSKI; O'BRODOVICH *et al.*, 2011). Basicamente, o alongamento mecânico sendo exercido de forma excessiva conduz a disfunção endotelial, e causa aumento da permeabilidade vascular, este estiramento ocorrendo ciclicamente, induzirá a um rearranjo do citoesqueleto, que envolve filamentos de actina, microtúbulos e outros filamentos intermediários, para adequação de acordo com as deformidades a que é submetido (SILVA; NEGRINI; ROCCO, 2015), sendo assim, o estresse causado mecanicamente, é compreendido como grande colaborador para surgimento de lesão pulmonar (STEFFEN; RUPPERT; HOYMANN; FUNKE *et al.*, 2017).

Sendo assim, em nosso estudo avaliamos se a administração intranasal de surfactante exógeno exerceria um papel protetor das unidades alveolares quanto à manutenção da sua dinâmica respiratória frente à ventilação mecânica, e, para isso, primeiramente, avaliamos influxo leucocitário das vias aéreas dos ratos nos diferentes grupos experimentais. Como esperado, a VM induziu a um maior influxo de leucócitos, inclusive de neutrófilos, para o lavado broncoalveolar e, surpreendentemente, o surfactante impediu esse aumento induzido pela VM. Resultados semelhantes foram

encontrados em ratos Sprague-Dawley ventilados com volume corrente de 10 mL/Kg, PEEP: 4 cmH₂O, FiO₂: 21% e 4h de duração pelo qual foi observado um aumento no influxo de neutrófilos para o LBA quando comparado ao controle (HIRSCH; CHALKLEY; BENTLEY; BURLINGAME *et al.*, 2014). Alguns autores têm sugerido a utilização de surfactante exógeno em quadros de lesão pulmonar aguda em razão da escassez do surfactante endógeno nestes pulmões (GREGORY; LONGMORE; MOXLEY; WHITSETT *et al.*, 1991; RAGHAVENDRAN; WILLSON; NOTTER, 2011). Rasaiah e colaboradores (2003) demonstraram experimentalmente que a terapia com surfactante exógeno em fase inicial de sepse em camundongos pode atenuar a disfunção da dinâmica pulmonar associado à ventilação mecânica, pelo qual foi mimetizado um modelo de sepse em ratos através de cirurgia de ligação e perfuração cecal, e, posteriormente, receberam administração de surfactante de extrato lípidico bovino a 100 mg/kg via traqueal, um grupo foi ventilado com Vt de 20 mL/kg e PEEP zero e o outro não ventilado, pode-se observar que no grupo VM, o surfactante exógeno proporcionou efeito de protetor quanto à disfunção na dinâmica pulmonar induzida pela VM, mesmo após 18 horas (RASAI AH; MALLOY; LEWIS; VELDHUIZEN, 2003). Em nosso modelo experimental de LPIV, demonstramos que o grupo surfactante teve menor infiltrado leucocitário nas vias aéreas dos animais submetidos a VM em modo controlado a volume.

A evolução do processo inflamatório também está diretamente associada à síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GRIFFITH; PENDYALA; HECKER; LEE *et al.*, 2009). As EROS representam moléculas de grande importância na função sinalizadora, em decorrência dos distúrbios gerados pela inflamação, e que denota disfunção no endotélio e lesão de tecido, quando deflagrada pelo aumento das EROS ocasionado principalmente por neutrófilos no foco inflamatório (MITTAL; SIDDIQUI; TRAN; REDDY *et al.*, 2014). Com a finalidade de atenuar os danos causados por agentes oxidantes, os pulmões de mamíferos possuem um aporte de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que atuam contra radicais causadores de lesão no parênquima pulmonar (CAMPOS; LEAL; COSTA; DE LIMA *et al.*, 2015).

Sabe-se que uma atividade metabólica intensa, pode iniciar lesões oxidativas ao nível das biomoléculas, e que o dano oxidativo, representado nos valores elevados de TBARS, provavelmente está correlacionado a disfunção do endotélio, que tem como

consequência, o aumento das EROs, como por exemplo o peróxido de hidrogênio, radical que promove danos em nível pulmonar e sistêmico (MAZULLO FILHO, 2012). A peroxidação lipídica é resultado da reação que ocorre em cadeia de radicais livres que, se não for cessada, poderá ocasionar de forma definitiva, danos à membrana das células, o que ainda pode culminar em morte celular (DE BURBURE; HEILIER; NEVE; BECKER *et al.*, 2007). Essa modificação estrutural, interfere na permeabilização, conduzindo prejuízos nas trocas de íons, e também na secreção de componentes presentes nas organelas como enzimas hidrolíticas de lisossomas e o favorecimento à síntese de produtos tóxicos para a célula, como o malondialdeído. A peroxidação associa oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado, o que leva a uma degradação oxidativa, portanto, causando danos aos fosfolipídios (LIMA; ABDALLA, 2001). Recentemente nosso grupo de pesquisa, utilizando camundongos C57BL/6 machos, demonstramos um aumento de peroxidação lipídica no grupo submetido a VM quando comparado aos animais controle, assim como um aumento na oxidação de proteínas e da atividade da SOD (BEZERRA; MENEZES; SOUZA; AFONSO *et al.*, 2017), corroborando com nossos resultados referentes à mesma enzima no grupo submetido à ventilação mecânica, identificamos também, alterações na defesa antioxidante apresentando aumento das enzimas catalase e glutathione peroxidase, como também aumento dos marcadores de dano tecidual evidenciado pelos valores de peroxidação lipídica e proteína carbonilada. No entanto, de modo inovador, a instilação de surfactante atenuou de forma significativa essas alterações dos marcadores oxidativos induzidos pela VM com alto volume corrente em nosso modelo experimental, o que sugere uma efetiva proteção ao parênquima pulmonar pelo surfactante exógeno.

Em situações de infecção pulmonares, as respostas relacionadas à inflamação aguda a agentes patógenos levam ao acometimento de lesão pulmonar aguda por meio de leucócitos, pela liberação de protease, formação das EROs, liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos (DARWISH; MUBAREKA; LILES, 2011; LUCAS; SRIDHAR; RICK; GORSHKOV *et al.*, 2012; MATTHAY; WARE; ZIMMERMAN, 2012). Em 2006, Vreugdenhil e colaboradores demonstraram que ratos com deficiência de surfactante submetido a duas horas de VM em modo controlado a pressão, apresentaram maiores níveis de marcadores pró-inflamatórios (MIP-2, IL-1b, and HSP70) no LBA e no homogenato pulmonar comparado aos animais não

ventilados. Em contrapartida, os animais que receberam a administração intratraqueal de surfactante exógeno, tiveram melhora de função pulmonar, no entanto não houve melhora dos parâmetros inflamatórios (VREUGDENHIL; LACHMANN; HAITSMAN; ZIJLSTRA *et al.*, 2006). Em um estudo clínico de Patterson e colaboradores (2013), pacientes submetidos a VM com volume corrente baixo, demonstraram haver uma diminuição da taxa de mediadores inflamatórios comparados aos pacientes ventilados com maior volume corrente (PATTERSON; YAO; RAMIC; LEWIS *et al.*, 2013).

Os mediadores inflamatórios tais como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão têm sido correlacionadas a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (OSAKI; MAEHARA; SATO; HOSHINO *et al.*, 2010), e também surgem como intermediários na síntese das EROs, exacerbando os danos causados ao pulmão. Elevadas taxas de TNF- α e IL-1 β foram mensuradas em aspirado traqueal de pacientes com SDRA, em um estudo de Bhatia e colaboradores (BHATIA; MOOCHHALA, 2004). Em nosso estudo, observamos um aumento considerável de CCL2, IL-1, IL-6 e TNF- α quando comparado ao grupo não ventilado, e surpreendentemente, a administração do surfactante impediu esse aumento não havendo diferença nos níveis entre os grupos não ventilados, sugerindo que o surfactante manteve a integridade cíclica dos alvéolos, ainda que sofrendo hiperdistensão em razão do volume corrente de 12mL/kg.

Importante ressaltar que, uma marcante característica da lesão pulmonar se dá pela deficiência e/ou perda de função do surfactante, onde se sugere que citocinas envolvidas na inflamação como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) atuem na redução de componentes do surfactante de forma direta ou indireta, quando ao induzir o extravazamento de proteínas nos alvéolos, resulta também em disfunção do surfactante (HALBERTSMA; VANEKER; SCHEFFER; VAN DER HOEVEN, 2005; KOBAYASHI; NITTA; GANZUKA; INUI *et al.*, 1991). O TNF- α e as interleucinas IL-1 β , IL-6 basicamente estão envolvidos na resposta inflamatória na fase aguda (NGUYEN THI DIEU; PHAM NHAT; CRAIG; DUONG-QUY, 2017), TNF- α e IL-1 β são produzidos por macrófagos ativados e desencadeiam um estímulo às células adjacentes para a síntese de quimiocinas e atuando na condição de agentes quimiotáticos aos pneumócitos, induzem liberação de IL-8, fazendo com que os neutrófilos migrem até o interior do alvéolo, após a ativação dessa cascata inflamatória (LEPPER-WOODFORD; CAREY; BYRNE; JENKINS *et al.*, 1991). No

entanto, a síntese das citocinas, quando em grandes proporções, representa um cenário desfavorável ao pulmão, causando prejuízo e elevando as taxas de mortalidade (NGUYEN THI DIEU; PHAM NHAT; CRAIG; DUONG-QUY, 2017; OSAKI; MAEHARA; SATO; HOSHINO *et al.*, 2010). Quanto às quimiocinas, em especial as pertencentes à família CC, elas promovem estímulo aos monócitos, bem como aos basófilos, eosinófilos, linfócitos –T e ainda às células Natural Killer, conhecidas como NK (MUKAIDA; SHIROO; MATSUSHIMA, 1989). Particularmente, as quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 representam uma classe de ação inflamatória (LE; ZHOU; IRIBARREN; WANG, 2004), onde CCL2 realiza a indução de quimiotaxia monocítica, e também outras ocorrências ligadas à quimiotaxia, tais como influxo de Ca^{2+} e expressão de integrinas (JIANG; BELLER; FRENDEL; GRAVES, 1992; PALOMINO; MARTI, 2015), CCL3 realiza a função de intermediar a migração de leucócitos do pulmão (BHATIA; ZEMANS; JEYASEELAN, 2012; STANDIFORD; KUNKEL; LUKACS; GREENBERGER *et al.*, 1995), e por último a CCL5, também conhecido por RANTES, tem a função de regulação e auxílio às células T, uma vez já em atividade (OPDENAKKER; FROYEN; FITEN; PROOST *et al.*, 1993; PALOMINO; MARTI, 2015). Identificamos um aumento de CCL3 no grupo VM que faz referência à migração leucocitária no LBA neste mesmo grupo, o que parece compreensível em razão da necessidade de recrutamento dessas células em resposta ao processo de inflamação devido ao alto volume corrente utilizado. Especificamente, houve uma diminuição de CCL2 no grupo que recebeu instilação com surfactante exógeno antes da VM, sugerindo que houve menor demanda de migração dos monócitos até as unidades alveolares em razão da medida protetora.

Por último, foram realizados estudos estereológicos nos parênquima pulmonar, para avaliar a arquitetura pulmonar e suas estruturas (KNUST; OCHS; GUNDERSEN; NYENGAARD, 2009; WEIBEL, 1973). No presente estudo, demonstramos que houve dano ao parênquima pulmonar, especificamente, observamos que o grupo ventilado com 12 mL/kg apresentou um aumento na densidade de espaço alveolar e redução da densidade de septos alveolares, confirmando que a VM em volumes exacerbados gera hiperdistensão contínua nos alvéolos, modificando assim sua conformação e causando estiramento dessas estruturas, sem possibilidade de manutenção de retração elástica, talvez causado pela disfunção do surfactante, resultando em estruturas de septo de aspecto fisiológico anormal, o que foi evitado pelo grupo em que foi administrado

surfactante exógeno antes da VM, por este apresentar características que propiciam a manutenção fisiológica, desencadeou um efeito protetor durante o tempo de ventilação utilizado em nosso estudo.

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que o alto volume corrente promoveu inflamação pulmonar aguda, desequilíbrio redox e alterações no parênquima pulmonar de ratos Wistar, sem doença pulmonar prévia, submetidos à ventilação mecânica durante um curto período de tempo. Todavia, a instilação intranasal com surfactante exógeno foi capaz de reduzir lesão pulmonar induzida pelo ventilador mecânico. Novos estudos experimentais e/ou clínicos serão necessários para elucidar os mecanismos de atuação do surfactante exógeno.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, 105, p. 121-126, 1984.

AL-MEHDI, A. B.; SHUMAN, H.; FISHER, A. B. Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. **Am J Physiol**, 272, n. 2 Pt 1, p. L294-300, Feb 1997.

ANDRADE, M. C.; SOUZA, A. B. F.; HORTA, J. G.; PAULA COSTA, G. *et al.* Applying Positive End-Expiratory Pressure During Mechanical Ventilation Causes Pulmonary Redox Imbalance and Inflammation in Rats. **Shock**, 50, n. 5, p. 572-578, Nov 2018.

ARGIRAS, E. P.; BLAKELEY, C. R.; DUNNILL, M. S.; OTREMSKI, S. *et al.* High PEEP decreases hyaline membrane formation in surfactant deficient lungs. **Br J Anaesth**, 59, n. 10, p. 1278-1285, Oct 1987.

AUGUSTO, L. A.; SYNGUELAKIS, M.; JOHANSSON, J.; PEDRON, T. *et al.* Interaction of pulmonary surfactant protein C with CD14 and lipopolysaccharide. **Infect Immun**, 71, n. 1, p. 61-67, Jan 2003.

AVERY, M. E.; MEAD, J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. **AMA J Dis Child**, 97, n. 5, Part 1, p. 517-523, May 1959.

BACHOFEN, H.; SCHURCH, S. Alveolar surface forces and lung architecture. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 129, n. 1, p. 183-193, May 2001.

BAILEY, T. C.; MARTIN, E. L.; ZHAO, L.; VELDHUIZEN, R. A. High oxygen concentrations predispose mouse lungs to the deleterious effects of high stretch ventilation. **J Appl Physiol (1985)**, 94, n. 3, p. 975-982, Mar 2003.

BAKER, A. B. Artificial respiration, the history of an idea. **Med Hist**, 15, n. 4, p. 336-351, Oct 1971.

BANDEIRA, A. C. B.; DA SILVA, R. C.; ROSSONI, J. V. J.; FIGUEIREDO, V. P. *et al.* Lycopene pretreatment improves hepatotoxicity induced by acetaminophen in C57BL/6 mice. **Bioorg Med Chem**, 25, n. 3, p. 1057-1065, Feb 1 2017.

BARBAS, C. S. V.; ÍSOLA, A. M.; FARIAS, A. M. D. C.; CAVALCANTI, A. B. *et al.* Recomendações brasileiras de ventilação mecânica 2013. Parte I. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 26, n. 2, p. 89-121, 2014-04 2014.

BATES, J. H.; IRVIN, C. G. Time dependence of recruitment and derecruitment in the lung: a theoretical model. **J Appl Physiol (1985)**, 93, n. 2, p. 705-713, Aug 2002.

BEITLER, J. R.; MALHOTRA, A.; THOMPSON, B. T. Ventilator-Induced Lung Injury. **Clin Chest Med**, 37, n. 4, p. 633-646, Dec 2016.

BERNARD, G. R.; ARTIGAS, A.; BRIGHAM, K. L.; CARLET, J. *et al.* The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **Am J Respir Crit Care Med**, 149, n. 3 Pt 1, p. 818-824, Mar 1994.

BEZERRA, F. S.; RAMOS, C. O.; CASTRO, T. F.; ARAUJO, N. *et al.* Exogenous surfactant prevents hyperoxia-induced lung injury in adult mice. **Intensive Care Med Exp**, 7, n. 1, p. 19, Mar 27 2019.

BHATIA, M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, 1, n. 4, p. 343-351, Dec 2002.

BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **J Pathol**, 202, n. 2, p. 145-156, Feb 2004.

BHATIA, M.; ZEMANS, R. L.; JEYASEELAN, S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 46, n. 5, p. 566-572, May 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976.

BROWER, R. G.; MATTHAY, M. A.; MORRIS, A.; SCHOENFELD, D. *et al.* Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, 342, n. 18, p. 1301-1308, May 4 2000.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, 52, p. 302-310, 1978.

BURNS, A. R.; SMITH, C. W.; WALKER, D. C. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. **Physiol Rev**, 83, n. 2, p. 309-336, Apr 2003.

BUXTON, G. V.; GREENSTOCK, C. L.; HELMAN, W. P.; ROSS, A. B. Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$) in Aqueous Solution. 2009-10-15 . research-article.

BÁRTHOLO, B. Imunidade inata e a importância dos receptores Toll- similar. **Pulmão RJ** 2009;, Supl. 2:52-8., 2009.

CAMPBELL, R. S.; DAVIS, B. R. Pressure-controlled versus volume-controlled ventilation: does it matter? **Respir Care**, 47, n. 4, p. 416-424; discussion 424-416, Apr 2002.

CAMPOS, K. K.; DOURADO, V. A.; DINIZ, M. F.; BEZERRA, F. S. *et al.* Exposure to cigarette smoke during pregnancy causes redox imbalance and histological damage in lung tissue of neonatal mice. **Exp Lung Res**, 40, n. 4, p. 164-171, Apr 2014.

CAMPOS, K. K.; LEAL, S. F.; COSTA, D. C.; DE LIMA, W. G. *et al.* Long-term exposure to ultrasonically nebulized distilled water and saline causes cellular influx and oxidative stress in lung tissue of rats. **Exp Lung Res**, 41, n. 10, p. 546-553, 2015.

CAMPOS, K. K.; MANSO, R. G.; GONCALVES, E. G.; SILVA, M. E. *et al.* Temporal analysis of oxidative effects on the pulmonary inflammatory response in mice exposed to cigarette smoke. **Cell Immunol**, 284, n. 1-2, p. 29-36, Jul-Aug 2013.

CAMPOS, K. K. D.; ARAUJO, G. R.; MARTINS, T. L.; BANDEIRA, A. C. B. *et al.* The antioxidant and anti-inflammatory properties of lycopene in mice lungs exposed to cigarette smoke. **J Nutr Biochem**, 48, p. 9-20, Oct 2017.

CAPELOZZI, V. L. Understanding the microscopic and submicroscopic structure of the alveolar-capillary membrane in acute lung injury. 2011 2011.

CARVALHO, C. R. R. D.; TOUFEN JUNIOR, C.; FRANCA, S. A. Ventilação mecânica: princípios, análise gráfica e modalidades ventilatórias. **J. bras. pneumol.**, 33, p. 54-70, 07/2007 2007.

CARVALHO, W. B. D.; MÂNGIA, C. M. F. Efeitos na função pulmonar após utilização de surfactante pulmonar exógeno na síndrome do desconforto respiratório agudo na criança. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43, n. 2, p. 145-150, 1997-06 1997.

CHEN, C. M.; CHENG, K. C.; LI, C. F.; ZHANG, H. The protective effects of glutamine in a rat model of ventilator-induced lung injury. *In: J Thorac Dis*, 2014. v. 6, p. 1704-1713.

CHEN, K.; STERNBACH, G. L.; FROMM, R. E., JR.; VARON, J. Mechanical ventilation: past and present. **J Emerg Med**, 16, n. 3, p. 453-460, May-Jun 1998.

CHESS, P. R.; BENSON, R. P.; MANISCALCO, W. M.; WRIGHT, T. W. *et al.* Murine mechanical ventilation stimulates alveolar epithelial cell proliferation. **Exp Lung Res**, 36, n. 6, p. 331-341, Aug 2010.

COIMBRA, R.; UNIVERSITY OF CALIFORNIA SAN DIEGO, S. D., USA; SILVERIO, C. C.; UNIVERSITY OF CALIFORNIA SAN DIEGO, S. D., USA. Novas estratégias de ventilação mecânica na lesão pulmonar aguda e na Síndrome da Angústia Respiratória Aguda. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 47, n. 4, p. 358-364, 12/2001 2001.

COLLINO, F.; RAPETTI, F.; VASQUES, F.; MAIOLO, G. *et al.* Positive End-expiratory Pressure and Mechanical Power. **Anesthesiology**, 130, n. 1, p. 119-130, Jan 2019.

CROSBY, L. M.; WATERS, C. M. Epithelial repair mechanisms in the lung. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 298, n. 6, p. L715-731, Jun 2010.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev**, 10, n. 4, p. 742-780, Oct 1997.

DANIELS, C. B.; ORGEIG, S. The comparative biology of pulmonary surfactant: past, present and future. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 129, n. 1, p. 9-36, May 2001.

DANIELS, C. B.; ORGEIG, S. Pulmonary Surfactant: The Key to the Evolution of Air Breathing. <https://doi.org/10.1152/nips.01438.2003>, 2003 Aug 01 2003. research-article.

DARWISH, I.; MUBAREKA, S.; LILES, W. C. Immunomodulatory therapy for severe influenza. **Expert Rev Anti Infect Ther**, 9, n. 7, p. 807-822, Jul 2011.

DAVIDOVICH, N.; DIPAOLO, B. C.; LAWRENCE, G. G.; CHHOUR, P. *et al.* Cyclic stretch-induced oxidative stress increases pulmonary alveolar epithelial permeability. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 49, n. 1, p. 156-164, Jul 2013.

DE BURBURE, C. Y.; HEILIER, J. F.; NEVE, J.; BECKER, A. *et al.* Lung permeability, antioxidant status, and NO₂ inhalation: a selenium supplementation study in rats. **J Toxicol Environ Health A**, 70, n. 3-4, p. 284-294, Feb 1 2007.

DE PROST, N.; RICARD, J. D.; SAUMON, G.; DREYFUSS, D. Ventilator-induced lung injury: historical perspectives and clinical implications. *In*: **Ann Intensive Care**, 2011. v. 1, p. 28.

DOS SANTOS, C. C.; SLUTSKY, A. S. Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. **J Appl Physiol (1985)**, 89, n. 4, p. 1645-1655, Oct 2000.

DREYFUSS, D.; SAUMON, G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. **Am J Respir Crit Care Med**, 157, n. 1, p. 294-323, Jan 1998.

DRINKER, P.; SHAW, L. A. AN APPARATUS FOR THE PROLONGED ADMINISTRATION OF ARTIFICIAL RESPIRATION: I. A Design for Adults and Children. **J Clin Invest**, 7, n. 2, p. 229-247, Jun 1929.

EICHEL, T.; DREUX, M. L. Negative or positive? The iron lung and poliomyelitis-Zurich, 1951. **Anaesth Intensive Care**, 45, n. 7, p. 13-20, Mar 2017.

EL-GENDY, N.; KAVIRATNA, A.; BERKLAND, C.; DHAR, P. Delivery and performance of surfactant replacement therapies to treat pulmonary disorders. **Ther Deliv**, 4, n. 8, p. 951-980, Aug 2013.

ELDER, A. S. F.; BERSTEN, A. D.; SACCONI, G. T. P.; BONDER, C. S. *et al.* Prevention and Amelioration of Rodent Ventilation-Induced Lung Injury with Either Prophylactic or Therapeutic feG Administration. **Lung**, Jul 12 2019.

ENGLE, W. A. Surfactant-replacement therapy for respiratory distress in the preterm and term neonate. **Pediatrics**, 121, n. 2, p. 419-432, Feb 2008.

FAFFE, D. S.; ZIN, W. A. Lung parenchymal mechanics in health and disease. **Physiol Rev**, 89, n. 3, p. 759-775, Jul 2009.

FAGEVIK OLSEN, M.; CARLSSON, M.; OLSEN, E.; WESTERDAHL, E. Evaluation of Pressure Generated by Resistors From Different Positive Expiratory Pressure Devices. **Respir Care**, 60, n. 10, p. 1418-1423, Oct 2015.

FAN, E.; VILLAR, J.; SLUTSKY, A. S. Novel approaches to minimize ventilator-induced lung injury. **BMC Med**, 11, p. 85, Mar 28 2013.

FONTELA, P. C.; PRESTES, R. B.; FORGIARINI JR, L. A.; FRIEDMAN, G. Ventilação mecânica variável. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 29, n. 1, p. 77-86, 2017-03 2017.

FREITAS, F. S. D.; SILVA, L. C. R.; TAVARES, L. D.; BARROSO, E. F. *et al.* APLICAÇÃO DA PRESSÃO POSITIVA EXPIRATÓRIA NAS VIAS AÉREAS (EPAP): existe um consenso? **22**, 2017-09-04 2009. Artigo.

FUJIWARA, T.; MAETA, H.; CHIDA, S.; MORITA, T. *et al.* Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. **Lancet**, 1, n. 8159, p. 55-59, Jan 12 1980.

GAMBAROTO, G. Fisioterapia Respiratória em unidade de terapia intensiva. **Editores Atheneu**, São Paulo, SP, 2006.

GATTINONI, L.; PESENTI, A. The concept of "baby lung". **Intensive Care Med**, 31, n. 6, p. 776-784, Jun 2005.

GHARIB, S. A.; LILES, W. C.; KLAFF, L. S.; ALTEMEIER, W. A. Noninjurious mechanical ventilation activates a proinflammatory transcriptional program in the lung. **Physiol Genomics**, 37, n. 3, p. 239-248, May 13 2009.

GOERKE, J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. **Biochim Biophys Acta**, 1408, n. 2-3, p. 79-89, Nov 19 1998.

GRASSO, S.; TERRAGNI, P.; MASCIA, L.; FANELLI, V. *et al.* Airway pressure-time curve profile (stress index) detects tidal recruitment/hyperinflation in experimental acute lung injury. **Crit Care Med**, 32, n. 4, p. 1018-1027, Apr 2004.

GREGORY, T. J.; LONGMORE, W. J.; MOXLEY, M. A.; WHITSETT, J. A. *et al.* Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. **J Clin Invest**, 88, n. 6, p. 1976-1981, Dec 1991.

GREGORY, T. J.; STEINBERG, K. P.; SPRAGG, R.; GADEK, J. E. *et al.* Bovine surfactant therapy for patients with acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 155, n. 4, p. 1309-1315, Apr 1997.

GRIFFITH, B.; PENDYALA, S.; HECKER, L.; LEE, P. J. *et al.* NOX enzymes and pulmonary disease. **Antioxid Redox Signal**, 11, n. 10, p. 2505-2516, Oct 2009.

GROMMES, J.; ALARD, J. E.; DRECHSLER, M.; WANTHA, S. *et al.* Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 185, n. 6, p. 628-636, Mar 15 2012.

GUNDUZ, K.; OZTURK, G.; SOZMEN, E. Y. Erythrocyte superoxide dismutase, catalase activities and plasma nitrite and nitrate levels in patients with Behcet disease and recurrent aphthous stomatitis. **Clin Exp Dermatol**, 29, n. 2, p. 176-179, Mar 2004.

HAAGSMAN, H. P.; HOGENKAMP, A.; VAN EIJK, M.; VELDHUIZEN, E. J. Surfactant collectins and innate immunity. **Neonatology**, 93, n. 4, p. 288-294, 2008.

HALBERTSMA, F. J.; VANEKER, M.; SCHEFFER, G. J.; VAN DER HOEVEN, J. G. Cytokines and bio-trauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. **Neth J Med**, 63, n. 10, p. 382-392, Nov 2005.

HARUMI MIYOSHI, M. Terapeutica de reposicao de surfactante. **Jornal de pediatria**, 77, n. supl, p. S3-S16, 2001.

HASAN, D.; BLANKMAN, P.; NIEMAN, G. F. Purinergic signalling links mechanical breath profile and alveolar mechanics with the pro-inflammatory innate immune response causing ventilation-induced lung injury. **Purinergic Signal**, 13, n. 3, p. 363-386, Sep 2017.

HAUBER, H. P.; KARP, D.; GOLDMANN, T.; VOLLMER, E. *et al.* Effect of low tidal volume ventilation on lung function and inflammation in mice. *In*: **BMC Pulm Med**, 2010. v. 10, p. 21.

HAWGOOD, S.; POULAIN, F. R. The pulmonary collectins and surfactant metabolism. **Annu Rev Physiol**, 63, p. 495-519, 2001.

HILLMAN, N. H.; KEMP, M. W.; NOBLE, P. B.; KALLAPUR, S. G. *et al.* Sustained inflation at birth did not protect preterm fetal sheep from lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 305, n. 6, p. L446-453, Sep 15 2013.

HIRSCH, J.; CHALKLEY, R. J.; BENTLEY, T.; BURLINGAME, A. L. *et al.* Double impact of cigarette smoke and mechanical ventilation on the alveolar epithelial type II cell. **Crit Care**, 18, n. 2, p. R50, Mar 25 2014.

HUSSEIN, O.; WALTERS, B.; STROETZ, R.; VALENCIA, P. *et al.* Biophysical determinants of alveolar epithelial plasma membrane wounding associated with mechanical ventilation. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00437.2012>, 2013 Oct 01 2013. research-article.

ITO, Y.; VELDHUIZEN, R. A.; YAO, L. J.; MCCAIG, L. A. *et al.* Ventilation strategies affect surfactant aggregate conversion in acute lung injury. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.155.2.9032184>, 2012-12-20 1997. abstract.

JABBARI, A.; ALIJANPOUR, E.; AMRI MALEH, P.; HEIDARI, B. Lung protection strategy as an effective treatment in acute respiratory distress syndrome. *In: Caspian J Intern Med*, 2013. v. 4, p. 560-563.

JAECKLIN, T.; ENGELBERTS, D.; OTULAKOWSKI, G.; O'BRODOVICH, H. *et al.* Lung-derived soluble mediators are pathogenic in ventilator-induced lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 300, n. 4, p. L648-658, Apr 2011.

JERRE, G.; BERALDO, M. A.; SILVA, T. D. J.; GASTALDI, A. *et al.* Fisioterapia no paciente sob ventilação mecânica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 19, n. 3, p. 399-407, 2007-09 2007.

JI, L. L.; STRATMAN, F. W.; LARDY, H. A. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. **Arch Biochem Biophys**, 263, n. 1, p. 150-160, May 15 1988.

JIANG, Y.; BELLER, D. I.; FRENDEL, G.; GRAVES, D. T. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **J Immunol**, 148, n. 8, p. 2423-2428, Apr 15 1992.

JOBE, A. H.; IKEGAMI, M. Surfactant Metabolism. **Clinics in Perinatology**, 20, n. 4, p. 683-696, 1993/12/01 1993.

KACMAREK, R. M. The mechanical ventilator: past, present, and future. **Respir Care**, 56, n. 8, p. 1170-1180, Aug 2011.

KELLY, G. T.; FARAJ, R.; ZHANG, Y.; MALTEPE, E. *et al.* Pulmonary Endothelial Mechanical Sensing and Signaling, a Story of Focal Adhesions and Integrins in Ventilator Induced Lung Injury. **Front Physiol**, 10, 2019.

KIM, D. H.; CHUNG, J. H.; SON, B. S.; KIM, Y. J. *et al.* Effect of a neutrophil elastase inhibitor on ventilator-induced lung injury in rats. *In: J Thorac Dis*, 2014. v. 6, p. 1681-1689.

KNUDSEN, L.; OCHS, M. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. **Histochem Cell Biol**, 150, n. 6, p. 661-676, Dec 2018.

KNUST, J.; OCHS, M.; GUNDERSEN, H. J.; NYENGAARD, J. R. Stereological estimates of alveolar number and size and capillary length and surface area in mice lungs. **Anat Rec (Hoboken)**, 292, n. 1, p. 113-122, Jan 2009.

KOBAYASHI, T.; NITTA, K.; GANZUKA, M.; INUI, S. *et al.* Inactivation of exogenous surfactant by pulmonary edema fluid. **Pediatr Res**, 29, n. 4 Pt 1, p. 353-356, Apr 1991.

KOTECHA, S.; CHAN, B.; AZAM, N.; SILVERMAN, M. *et al.* Increase in interleukin-8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in bronchoalveolar lavage fluid from premature infants who develop chronic lung disease. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, 72, n. 2, p. F90-96, Mar 1995.

KOZIAN, A.; SCHILLING, T.; SCHUTZE, H.; SENTURK, M. *et al.* Ventilatory protective strategies during thoracic surgery: effects of alveolar recruitment maneuver and low-tidal volume ventilation on lung density distribution. **Anesthesiology**, 114, n. 5, p. 1025-1035, May 2011.

KROPP, R. Die Eiserne Lunge. **Pneumologie**, 67, p. 522-524, 2013/09/04 2013.

LE, Y.; ZHOU, Y.; IRIBARREN, P.; WANG, J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. **Cell Mol Immunol**, 1, n. 2, p. 95-104, Apr 2004.

LEEPER-WOODFORD, S. K.; CAREY, P. D.; BYRNE, K.; JENKINS, J. K. *et al.* Tumor necrosis factor. Alpha and beta subtypes appear in circulation during onset of sepsis-induced lung injury. **Am Rev Respir Dis**, 143, n. 5 Pt 1, p. 1076-1082, May 1991.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, 7, n. 9, p. 678-689, Sep 2007.

LI, R.; JIA, Z.; TRUSH, M. A. Defining ROS in Biology and Medicine. **React Oxyg Species (Apex)**, 1, n. 1, p. 9-21, 2016.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas / Lipid peroxidation: mechanisms and evaluation in biological samples. Revista brasileira de ciências farmacêuticas. 2001.

LOHSER, J.; SLINGER, P. Lung Injury After One-Lung Ventilation: A Review of the Pathophysiologic Mechanisms Affecting the Ventilated and the Collapsed Lung. **Anesth Analg**, 121, n. 2, p. 302-318, Aug 2015.

LOPES, A. J.; NORONHA, A. J.; MAFORT, T. T. Mecanismos de defesa do aparelho respiratório. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, 9, n. 2, p. 11-16, 2010.

LUCAS, R.; SRIDHAR, S.; RICK, F. G.; GORSHKOV, B. *et al.* Agonist of growth hormone-releasing hormone reduces pneumolysin-induced pulmonary permeability edema. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 109, n. 6, p. 2084-2089, Feb 7 2012.

MACHADO, D. F.; CAMPOS, K. K. D.; DA SILVA, N. P.; DE OLIVEIRA RAMOS, C. *et al.* The administration of surfactant decreased oxidative stress in lungs of mice exposed to cigarette smoke. **Int Immunopharmacol**, 54, p. 275-279, Jan 2018.

MALO, J.; ALI, J.; WOOD, L. D. How does positive end-expiratory pressure reduce intrapulmonary shunt in canine pulmonary edema? **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, 57, n. 4, p. 1002-1010, Oct 1984.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, 75, n. 4, p. 469-486, Dec 2003.

MARCY, T. W.; MARINI, J. J. Inverse ratio ventilation in ARDS. Rationale and implementation. **Chest**, 100, n. 2, p. 494-504, Aug 1991.

MARINI, J. J. Mechanical ventilation: past lessons and the near future. **Critical Care**, 17, n. 1, p. 1-10, 2013-03-12 2013. ReviewPaper.

MARINI, J. J. Evolving concepts for safer ventilation. **Critical Care**, 23, n. 1, p. 1-7, 2019-06-14 2019. ReviewPaper.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, 47, n. 3, p. 469-474, Sep 16 1974.

MATTHAY, M. A.; WARE, L. B.; ZIMMERMAN, G. A. The acute respiratory distress syndrome. **J Clin Invest**, 122, n. 8, p. 2731-2740, Aug 2012.

MATUSCHAK, G. M.; LECHNER, A. J. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and treatment. **Mo Med**, 107, n. 4, p. 252-258, Jul-Aug 2010.

MAZULLO FILHO, J. B. R.; BONA, S.; ROSA, D. P. D.; SILVA, F. G. D. *et al.* Os efeitos da ventilação mecânica no estresse oxidativo. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 24, n. 1, p. 23-29, 2012-03 2012.

MEAD, J.; TAKISHIMA, T.; LEITH, D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. **J Appl Physiol**, 28, n. 5, p. 596-608, May 1970.

MEDEIROS, E.; ALEGRETTI, L.; BADALOTTO, D.; MARASCHIN, R. *et al.* Perfil de pacientes em ventilação mecânica invasiva em uma unidade de terapia intensiva. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, 3, p. 18-24, 02/01 2012.

MEHTA, S.; HILL, N. S. Noninvasive ventilation. **Am J Respir Crit Care Med**, 163, n. 2, p. 540-577, Feb 2001.

MITTAL, M.; SIDDIQUI, M. R.; TRAN, K.; REDDY, S. P. *et al.* Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *In: Antioxid Redox Signal*, 2014. v. 20, p. 1126-1167.

MORAES, A. A. D. C.; ARAUJO, L. A.; ARAÚJO, R. A. C. D.; ROCHA, R. S. B. *et al.* Estresse oxidativo na interrupção da ventilação mecânica em pacientes vítimas de traumatismo cranioencefálico: um estudo randomizado e cego. **43**, 2018-12-20 2018. Artigos Originais.

MOREIRA JS, A., CF. (ed.). **Mecanismos do Aparelho Respiratório**. Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan. 131-9 ed. 2008. (Doenças Pulmonares, v. 6ª edição.).

MORIONDO, A.; MARCOZZI, C.; BIANCHIN, F.; REGUZZONI, M. *et al.* Impact of mechanical ventilation and fluid load on pulmonary glycosaminoglycans. **Respir Physiol Neurobiol**, 181, n. 3, p. 308-320, May 31 2012.

MUKAIDA, N.; SHIROO, M.; MATSUSHIMA, K. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. **J Immunol**, 143, n. 4, p. 1366-1371, Aug 15 1989.

MURTA, G. L.; CAMPOS, K. K.; BANDEIRA, A. C.; DINIZ, M. F. *et al.* Oxidative effects on lung inflammatory response in rats exposed to different concentrations of formaldehyde. **Environ Pollut**, 211, p. 206-213, Apr 2016.

MUSCEDERE, J. G.; MULLEN, J. B.; GAN, K.; SLUTSKY, A. S. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 149, n. 5, p. 1327-1334, May 1994.

NAGATO, A.; SILVA, F. L.; SILVA, A. R.; BEZERRA, F. S. *et al.* Hyperoxia-induced lung injury is dose dependent in Wistar rats. **Exp Lung Res**, 35, n. 8, p. 713-728, Oct 2009.

NAGATO, A. C.; BEZERRA, F. S.; LANZETTI, M.; LOPES, A. A. *et al.* Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. **Int J Exp Pathol**, 93, n. 4, p. 269-278, Aug 2012.

NAKAMURA, T.; MALLOY, J.; MCCAIG, L.; YAO, L. J. *et al.* Mechanical ventilation of isolated septic rat lungs: effects on surfactant and inflammatory cytokines. **J Appl Physiol** (1985), 91, n. 2, p. 811-820, Aug 2001.

NARDELLI, L. M.; GARCIA, C. S.; PASSARO, C. P.; ROCCO, P. R. [Understanding the mechanisms of ventilator-induced lung injury]. **Rev Bras Ter Intensiva**, 19, n. 4, p. 469-474, Dec 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª EDIÇÃO ed. 2014.

NGUYEN THI DIEU, T.; PHAM NHAT, A.; CRAIG, T. J.; DUONG-QUY, S. Clinical characteristics and cytokine changes in children with pneumonia requiring mechanical ventilation. *In: J Int Med Res*, 2017. v. 45, p. 1805-1817.

NIEMAN, G. F.; ANDREWS, P.; SATALIN, J.; WILCOX, K. *et al.* Acute lung injury: how to stabilize a broken lung. **Critical Care**, 22, n. 1, p. 1-11, 2018-05-24 2018. OriginalPaper.

NOTTER, R. H.; SHAPIRO, D. L. Lung surfactants for replacement therapy: biochemical, biophysical, and clinical aspects. **Clin Perinatol**, 14, n. 3, p. 433-479, Sep 1987.

OCHIAI, R. Mechanical ventilation of acute respiratory distress syndrome. **Journal of Intensive Care**, 3, n. 1, p. 1-9, 2015-06-17 2015. ReviewPaper.

OECKLER, R. A.; HUBMAYR, R. D. Ventilator-associated lung injury: a search for better therapeutic targets. 2007-12-01 2007.

OPDENAKKER, G.; FROYEN, G.; FITEN, P.; PROOST, P. *et al.* Human monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3): molecular cloning of the cDNA and comparison with other chemokines. **Biochem Biophys Res Commun**, 191, n. 2, p. 535-542, Mar 15 1993.

OSAKI, Y.; MAEHARA, Y.; SATO, M.; HOSHINO, A. *et al.* Analysis of cytokine/chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluids from patients with acute respiratory distress syndrome. **日本集中治療医学会雑誌**, 17, n. 2, p. 179-184, 2010.

OTIS, A. B.; FENN, W. O.; RAHN, H. Mechanics of breathing in man. **J Appl Physiol**, 2, n. 11, p. 592-607, May 1950.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo)**, 13, n. 3, p. 469-473, 2015-09 2015.

PATTERSON, E. K.; YAO, L. J.; RAMIC, N.; LEWIS, J. F. *et al.* Lung-derived mediators induce cytokine production in downstream organs via an NF-kappaB-dependent mechanism. **Mediators Inflamm**, 2013, p. 586895, 2013.

PENA, K. B.; RAMOS CDE, O.; SOARES, N. P.; DA SILVA, P. F. *et al.* The administration of a high refined carbohydrate diet promoted an increase in pulmonary inflammation and oxidative stress in mice exposed to cigarette smoke. *In: Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2016. v. 11, p. 3207-3217.

PENITENTE, A. R.; LEITE, A. L.; DE PAULA COSTA, G.; SHRESTHA, D. *et al.* Enalapril in Combination with Benznidazole Reduces Cardiac Inflammation and Creatine Kinases in Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg**, 93, n. 5, p. 976-982, Nov 2015.

PERRY, S. F.; DUNCKER, H. R. Lung architecture volume and static mechanics in five species of lizards. **Respir Physiol**, 34, n. 1, p. 61-81, Jul 1978.

PINGLETON, S. K. Complications of Acute Respiratory Failure. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/137.6.1463>, 2012-12-17 1988. research-article.

PIRES, K. M. P.; MELO, A. C.; LANZETTI, M.; CASQUILHO, N. V. *et al.* Ventilação mecânica com baixo volume corrente e estresse oxidativo em pulmões saudáveis de camundongos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 38, n. 1, p. 98-104, 2012-02 2012.

PUGIN, J.; DUNN, I.; JOLLIET, P.; TASSAUX, D. *et al.* Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. **Am J Physiol**, 275, n. 6, p. L1040-1050, Dec 1998.

PUNTORIERI, V.; HIANSEN, J. Q.; MCCAIG, L. A.; YAO, L. J. *et al.* The effects of exogenous surfactant administration on ventilation-induced inflammation in mouse models of lung injury. *In: BMC Pulm Med*, 2013. v. 13, p. 67.

PÁDUA, A.; MARTINEZ, J. MODOS DE ASSISTÊNCIA VENTILATÓRIA. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, 34, p. 133, 06/30 2001.

RAGHAVENDRAN, K.; WILLSON, D.; NOTTER, R. Surfactant Therapy of ALI and ARDS. **Crit Care Clin**, 27, n. 3, p. 525-559, Jul 1 2011.

RAHMAN, I. Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. **Mutat Res**, 579, n. 1-2, p. 58-80, Nov 11 2005.

RASAIHAH, V. P.; MALLOY, J. L.; LEWIS, J. F.; VELDHUIZEN, R. A. Early surfactant administration protects against lung dysfunction in a mouse model of ARDS. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 284, n. 5, p. L783-790, May 2003.

RAZ, E.; MAHABALESHWAR, H. Chemokine signaling in embryonic cell migration: a fisheye view. **Development**, 136, n. 8, p. 1223-1229, Apr 2009.

REBELLO, C. M.; PAULO, U. D. S.; EINSTEIN, H. I. A.; PROENÇA, R. S. M. *et al.* Terapia com surfactante pulmonar exógeno: o que é estabelecido e o que necessitamos determinar. **Jornal de Pediatria**, 78, p. 215-226, 12/2002 2002.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, 233, p. 357-363, 1994.

ROLLINS, B. J.; MORRISON, E. D.; STILES, C. D. Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 85, n. 11, p. 3738-3742, Jun 1988.

ROONEY, S. A. Lung surfactant. **Environ Health Perspect**, 55, p. 205-226, Apr 1984.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev Immunol**, 18, p. 217-242, 2000.

ROUBY, J. J.; LHERM, T.; MARTIN DE LASSALE, E.; POETE, P. *et al.* Histologic aspects of pulmonary barotrauma in critically ill patients with acute respiratory failure. **Intensive Care Med**, 19, n. 7, p. 383-389, 1993.

ROY, S.; HABASHI, N.; SADOWITZ, B.; ANDREWS, P. *et al.* Early airway pressure release ventilation prevents ARDS-a novel preventive approach to lung injury. **Shock**, 39, n. 1, p. 28-38, Jan 2013.

RUDIGER, M.; KOLLECK, I.; PUTZ, G.; WAUER, R. R. *et al.* Plasmalogens effectively reduce the surface tension of surfactant-like phospholipid mixtures. **Am J Physiol**, 274, n. 1, p. L143-148, Jan 1998.

SARDESAI, S.; BINIWALE, M.; WERTHEIMER, F.; GARINGO, A. *et al.* Evolution of surfactant therapy for respiratory distress syndrome: past, present, and future. **Pediatr Res**, 81, n. 1-2, p. 240-248, Jan 2017.

SHELLEY, S. A.; BALIS, J. U.; PACIGA, J. E.; ESPINOZA, C. G. *et al.* Biochemical composition of adult human lung surfactant. **Lung**, 160, n. 4, p. 195-206, 1982.

SILVA, J. D.; MARON-GUTIERREZ, T.; ROCCO, P. R. M.; GARCIA, C. S. N. B. Surfactant therapy in acute respiratory distress syndrome: pros and cons. 2009 2009.

SILVA, P. L.; NEGRINI, D.; ROCCO, P. R. Mechanisms of ventilator-induced lung injury in healthy lungs. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, 29, n. 3, p. 301-313, Sep 2015.

SILVEYRA, P.; FLOROS, J. Genetic variant associations of human SP-A and SP-D with acute and chronic lung injury. **Front Biosci (Landmark Ed)**, 17, p. 407-429, Jan 1 2012.

SLUTSKY, A. S. History of Mechanical Ventilation. From Vesalius to Ventilator-induced Lung Injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 191, n. 10, p. 1106-1115, May 15 2015.

SOARES, N. P.; CAMPOS, K. K.; PENA, K. B.; BANDEIRA, A. C. *et al.* The Effects of the Combination of a Refined Carbohydrate Diet and Exposure to Hyperoxia in Mice. **Oxid Med Cell Longev**, 2016, p. 1014928, 2016.

SOMMER, C.; FLETCHER, W. Cytokines, chemokines, and pain. **Pharmacology of Pain**, p. <http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=84975141593&partnerID=84975141598YFLogxK>, 2015.

SOUZA, A. B. F. D.; Efeitos da dieta hiperlipídica sobre o desequilíbrio redox e a resposta inflamatória pulmonar e sistêmica em camundongos submetidos à ventilação mecânica. 2017. Dissertacao.

STANDIFORD, T. J.; KUNKEL, S. L.; LUKACS, N. W.; GREENBERGER, M. J. *et al.* Macrophage inflammatory protein-1 alpha mediates lung leukocyte recruitment, lung capillary leak, and early mortality in murine endotoxemia. **J Immunol**, 155, n. 3, p. 1515-1524, Aug 1 1995.

STEFFEN, L.; RUPPERT, C.; HOYMANN, H. G.; FUNKE, M. *et al.* Surfactant replacement therapy reduces acute lung injury and collapse induration-related lung remodeling in the bleomycin model. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 313, n. 2, p. L313-L327, Aug 1 2017.

STERNBACH, G. L.; VARON, J.; FROMM, R. E.; SICURO, M. *et al.* Galen and the origins of artificial ventilation, the arteries and the pulse. **Resuscitation**, 49, n. 2, p. 119-122, May 2001.

STOCKLEY, E.; VALOTAIRE, R.; MILLER, M.; DA SILVA, O. Effects of bovine lipid extract surfactant administration in preterm infants treated for respiratory distress syndrome. *In: Health Sci Rep*, 2018. v. 1.

STONE, J. R.; YANG, S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. **Antioxid Redox Signal**, 8, n. 3-4, p. 243-270, Mar-Apr 2006.

SUKI, B.; HUBMAYR, R. Epithelial and endothelial damage induced by mechanical ventilation modes. **Curr Opin Crit Care**, 20, n. 1, p. 17-24, Feb 2014.

SWEET, D. G.; CARNIELLI, V.; GREISEN, G.; HALLMAN, M. *et al.* European Consensus Guidelines on the Management of Respiratory Distress Syndrome - 2016 Update. **Neonatology**, 111, n. 2, p. 107-125, 2017.

SWEETNAM, W. P. Book Reviews. **British Medical Bulletin**, 9, n. 3, p. 243-244, 1953.

TOBIN, M. J.; CHADHA, T. S.; JENOURI, G.; BIRCH, S. J. *et al.* Breathing patterns. 1. Normal subjects. **Chest**, 84, n. 2, p. 202-205, Aug 1983.

TREMBLAY, L.; VALENZA, F.; RIBEIRO, S. P.; LI, J. *et al.* Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. **J Clin Invest**, 99, n. 5, p. 944-952, Mar 1 1997.

TREMBLAY, L. N.; SLUTSKY, A. S. Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma. **Proc Assoc Am Physicians**, 110, n. 6, p. 482-488, Nov-Dec 1998.

TREMBLAY, L. N.; SLUTSKY, A. S. Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside. **Intensive Care Med**, 32, n. 1, p. 24-33, Jan 2006.

TUCCI, M. R. Lesão pulmonar induzida pelo ventilador. MARCELO A. BERALDO, E. L. V. C. 2011.

TUSMAN, G.; BOHM, S. H. Prevention and reversal of lung collapse during the intra-operative period. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, 24, n. 2, p. 183-197, Jun 2010.

ULTRA, B. R. Fisioterapia Intensiva. **Editora Guanabara-Koogan**, Rio de Janeiro, RJ, 2ª edição, p. <https://www.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/fisioterapia/gasometria-arterial/22203>, 2009.

VIANA, M. E. G.; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, R. D. J.; SARGENTELLI, G. A.; PRONTOBABY HOSPITAL DA CRIANÇA, R. D. J. *et al.* O impacto de estratégias de ventilação mecânica que minimizam o atelectrauma em um modelo experimental de lesão pulmonar aguda. **Jornal de Pediatria**, 80, n. 3, p. 189-196, 06/2004 2004.

VILLAR, J.; KACMAREK, R. M.; HEDENSTIERNA, G. From ventilator-induced lung injury to physician-induced lung injury: why the reluctance to use small tidal volumes? **Acta Anaesthesiol Scand**, 48, n. 3, p. 267-271, Mar 2004.

VILLAR, J.; SULEMANJI, D.; KACMAREK, R. M. The acute respiratory distress syndrome: incidence and mortality, has it changed? **Curr Opin Crit Care**, 20, n. 1, p. 3-9, Feb 2014.

VIOLA, A.; LUSTER, A. D. Chemokines and Their Receptors: Drug Targets in Immunity and Inflammation. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.121806.154841>, 2008-01-09 2008. review-article.

VLAHAKIS, N. E.; HUBMAYR, R. D. Cellular Stress Failure in Ventilator-injured Lungs. *In: Am J Respir Crit Care Med*, 2005. v. 171, p. 1328-1342.

VREUGDENHIL, H. A.; LACHMANN, B.; HAITSMAN, J. J.; ZIJLSTRA, J. *et al.* Exogenous surfactant restores lung function but not peripheral immunosuppression in ventilated surfactant-deficient rats. *Exp Lung Res*, 32, n. 1-2, p. 1-14, Jan-Feb 2006.

WANG, G.; GUO, X.; DIANGELO, S.; THOMAS, N. J. *et al.* Humanized SFTPA1 and SFTPA2 Transgenic Mice Reveal Functional Divergence of SP-A1 and SP-A2: FORMATION OF TUBULAR MYELIN IN VIVO REQUIRES BOTH GENE PRODUCTS*. *In: J Biol Chem*, 2010. v. 285, p. 11998-12010.

WEBB, H. H.; TIERNEY, D. F. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*, 110, n. 5, p. 556-565, Nov 1974.

WEIBEL, E. R. Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange. *Physiol Rev*, 53, n. 2, p. 419-495, Apr 1973.

WHITSETT, J. A.; WEAVER, T. E. Alveolar development and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 53, n. 1, p. 1-7, Jul 2015.

YOUNG, J. D.; SYKES, M. K. Assisted ventilation. 1. Artificial ventilation: history, equipment and techniques. *Thorax*, 45, n. 10, p. 753-758, Oct 1990.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, 45, n. 2, p. 27-37, Spring 2007.

ZUO, Y. Y.; VELDHUIZEN, R. A.; NEUMANN, A. W.; PETERSEN, N. O. *et al.* Current perspectives in pulmonary surfactant--inhibition, enhancement and evaluation. *Biochim Biophys Acta*, 1778, n. 10, p. 1947-1977, Oct 2008.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de Aprovação do CEUA

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-1, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3550-1368 Fax: (31) 3550-1370
Email: ceua@ufop.br

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2018/06, intitulado "Os efeitos terapêuticos do surfactante exógeno de origem bovina sobre o desequilíbrio redox e a resposta inflamatória em ratos Wistar submetidos à ventilação mecânica", que tem como responsável o/a Prof(a). Dr(a) Frank Silva Bezerra, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados					
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Peso aprox.	Sexo	Procedência
Ratos/Wistar	76	8-10 semanas	290-360g	Machos	CCA/UFOP

Restrição de dieta: sim não

Especificar a dieta:

Este Certificado expira em: 16/05/2021

Ouro Preto, 26 de março de 2018.

Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da CEUA/UFOP.

Anexo 2. Certificado de apresentação de pôster



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho 09.006 - Exogenous surfactant attenuates ventilator-induced lung injury in healthy rats - Paula LC, Chirico RN, Castro TF, Candido LS, Bezerra FS, Matos NA, Department of Biological Sciences - UFOP foi apresentado na forma de painel durante a XXXIV Reunião Anual da FeSBE, realizado de 09 de setembro de 2019 a 13 de setembro de 2019 no Campos do Jordão Convention Center.


 Prof. Dr. Hermandes Faustino de Carvalho
 Presidente da FeSBE


 Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel
 1º Secretário Geral da FeSBE



