

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
PPG CBIOL

---

## Dissertação

---

# **Estudo dos efeitos da ventilação mecânica com diferentes volumes correntes em pulmões saudáveis de ratos Wistar**

*Leandro da Silva Cândido*

Ouro Preto  
2019



# **ESTUDO DOS EFEITOS DA VENTILAÇÃO MECÂNICA COM DIFERENTES VOLUMES CORRENTES EM PULMÕES SAUDÁVEIS DE RATOS WISTAR**

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 em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

Coorientadora: Dra. Natália Alves de Matos

Ouro Preto, Minas Gerais

Outubro de 2019

C217e

Cândido, Leandro da Silva.

Estudo dos efeitos da ventilação mecânica com diferentes volumes correntes em pulmões saudáveis de ratos Wistar [manuscrito] / Leandro da Silva Cândido. - 2019.

80f.: il.: color; tabs. (1)

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra.

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Natália Alves de Matos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Respiração artificial. 2. Pulmões - Inflamação. 3. Stress oxidativo. I. Bezerra, Frank Silva. II. Matos, Natália Alves de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.24

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



**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 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação do mestrando Leandro da Silva Cândido, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Frank Silva Bezerra (Presidente - UFOP), pelo Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt (Membro - UFOP), pela Profa. Dra. Maria da Glória Rodrigues-Machado (Membro - Externo) 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 "Estudo dos Efeitos da Ventilação Mecânica com Diferentes Volumes Correntes em Pulmões Saudáveis de Ratos Wistar", 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. Bruno Mendes Roatt; 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 retrassem 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

Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt

Profa. Dra. Maria da Glória  
Rodrigues-Machado

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 à memória de minha avó Antônia Cândido, que mesmo com todas as dificuldades não mediu esforços para me proporcionar a oportunidade de estudar.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me proporcionado forças para esse sonho torna-se realidade.

Sou grato a minha família e amigos por entenderem minha ausência em alguns momentos no decorrer desse período de estudo. Agradeço em especial minha irmã Ludmila da Silva Cândido, aos meus pais Juarez Cândido e Cilézia Maria da Silva, sou eternamente grato pelo apoio e pelo amor incondicional a mim ofertados em cada momento desse projeto.

Agradeço à minha noiva Aline Maria dos Santos, pelo apoio, amor e companheirismo a mim dispensados em cada momento. Obrigado por me incentivar diariamente, obrigado por acreditar que sou capaz e por me fazer acreditar que eu seria capaz!

Ao meu orientador Dr. Frank Silva Bezerra, por me oferecer a oportunidade de compartilhar conhecimento e proporcionar crescimento diário em seu laboratório com todos alunos. Sou grato pela consideração e parceria em cada momento desse projeto, sou grato por cada “prezado, aguardo retorno”, “prezado, solicito reunião”, afinal, foram norteadores para chegarmos em cada nova etapa deste projeto.

À minha coorientadora Dra. Natália Alves de Matos, pela extrema dedicação demonstrada desde o primeiro momento, pela parceria que foi fundamental para o desenvolvimento deste estudo. Muito obrigado por compartilhar seu conhecimento com tanto carinho e comprometimento.

Ao Professor Dr. Leonardo Máximo Cardoso por me incentivar desde quando o mestrado ainda era um sonho distante. Obrigado pela disponibilidade e dedicação em cada dúvida sanada.

Agradeço a toda equipe do LAFEx, que sem exceção, foram extremamente importantes e fundamentais no desenvolvimento deste trabalho, sou grato ao conhecimento e comprometimento de cada um de vocês, irei levar para vida.

Deixo meu agradecimento especial ao Thalles de Freitas Castro, Ana Beatriz Farias de Souza, Rafael Neto Chirico, Matheus Rocha, Laisy Cristina de Paula, Michel Ângelo Oliveira, Amanda Miranda e Pedro Júnior que foram parceiros em cada experimento. Muito obrigado!

Aos professores Dr. Luiz Eduardo de Souza por me orientar na disciplina de Estágio em Docência e a Dra. Silvia Dantas Cangussú pela essencial ajuda com as análises histológicas. Ao professor Dr. Rodrigo Cunha de Alvim Menezes por auxiliar no aprendizado de técnicas. Ao Dr. Guilherme de Paula Costa pela essencial ajuda com as análises inflamatórias.

À Santa Casa de Misericórdia de Ouro Preto por ofertar oportunidade de aplicar diariamente o conhecimento na área da fisioterapia e ventilação mecânica e a Nova Biomedical pelo auxílio financeiro com as análises gasométricas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, obrigada pelos importantes ensinamentos compartilhados em cada aula.

À Banca Examinadora pela atenção dispensada na leitura desse trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) pela concessão de espaço físico, equipamentos e laboratórios.

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP.

Aos laboratórios colaboradores, Laboratório de Imunopatologia (LIMP), Laboratório de Imunobiologia da Inflamação (LABIIN) e Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC).

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFOP, pelo apoio financeiro.

E a TODOS que de alguma maneira me ajudaram, meu MUITO OBRIGADO!

## RESUMO

A ventilação mecânica (VM) é uma estratégia essencial no tratamento de pacientes críticos e tem por objetivo proporcionar a melhoria das trocas gasosas em pacientes sob ventilação artificial. Entretanto, os efeitos de diferentes volumes correntes em pulmões saudáveis necessitam de mais estudos experimentais e clínicos. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da ventilação mecânica com diferentes volumes correntes sobre o desequilíbrio redox e a resposta inflamatória pulmonar em ratos saudáveis. Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto segundo o Protocolo nº 2017/42. Os ratos machos Wistar foram divididos em 4 grupos: O grupo controle (GC), animais em ventilação espontânea e expostos ao ar ambiente, e animais anestesiados, paralisados, traqueostomizados e submetidos à VM (Inspira Advanced Safety Ventilator, Harvard Apparatus) com os seguintes parâmetros ventilatórios: Modo ventilação controlada à volume (VCV), baixo volume corrente 4 mL/kg (VM4) ou 8 mL/kg (VM8) ou 12 mL/kg (VM12), pressão expiratória final positiva (PEEP) de 0 cmH<sub>2</sub>O, frequência respiratória: 70 irpm, relação I:E de 1:2 e Fração inspirada de oxigênio de 21%, durante 1 hora. Durante este experimento, os parâmetros ventilatórios e hemodinâmicos foram monitorados. Ao final do experimento, o sangue arterial, o lavado broncoalveolar (LBA) e o tecido pulmonar foram coletados para análises estereológicas e bioquímicas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00. Os dados foram expressos como média ± erro padrão de média e a diferença significativa foi considerada quando o valor de  $p < 0,05$ . Como resultados, a VM com alto volume corrente promoveu o aumento do influxo de neutrófilos no VM12 em relação ao GC, VM4 e VM8 no LBA. No homogenato pulmonar, observou-se um aumento dos níveis de CCL5, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 em VM12 em relação ao GC e VM4. Os parâmetros bioquímicos mostraram um aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD) em VM12 comparado ao GC e VM4. Em relação à atividade da catalase (CAT), houve um aumento em VM12 em relação ao GC. O dano no parênquima pulmonar foi avaliado pela oxidação de proteínas e peroxidação de lipídeos, houve um aumento da peroxidação lipídica no VM12 em relação ao GC, VM4 e VM8, bem como aumento da oxidação de proteínas no VM12 em relação ao GC e VM4. Para as análises estereológicas, houve aumento da densidade de volume do espaço alveolar ( $V_v [a]$ ) em VM12 em relação ao GC e VM4. Entretanto, houve uma diminuição da densidade de volume do septo alveolar ( $V_v [sa]$ ) no grupo VM12 em relação ao GC e VM4. Nas análises dos gases sanguíneos arteriais, observou-se que a PCO<sub>2</sub> (mmHg) em VM12 foi menor que o GC, VM4 e VM8. O parâmetro HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> também foi menor no grupo VM12 quando comparado ao GC, VM4 e VM8. Em relação à PO<sub>2</sub> (mmHg), houve diminuição no grupo VM4 em relação ao GC. Nossos resultados mostraram que o alto volume corrente promoveu inflamação pulmonar aguda e desequilíbrio redox em ratos adultos saudáveis submetidos à ventilação mecânica durante um curto período de tempo.

Palavras-chave: ventilação mecânica, alto volume corrente, estresse oxidativo, inflamação pulmonar.

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

## ABSTRACT

Mechanical ventilation (MV) is an essential strategy in the treatment of critical patients it aims to provide adequate gas exchange in MV patients. However, the effects of different tidal volumes on healthy lungs require further experimental and clinical studies. This study aimed to evaluate the effects of mechanical ventilation with different tidal volumes on redox imbalance and pulmonary inflammatory response in healthy rats. This study was approved by The Animal Use Ethics Commission (CEUA) of the Federal University of Ouro Preto according to the Protocol nº 2017/42. The male Wistar rats were divided into 4 groups: The control group (CG), animals spontaneously ventilated and exposed to ambient air, and animals were anesthetized, paralyzed, tracheostomized and submitted to MV (Inspira Advanced Safety Ventilator, Harvard Apparatus) with the following ventilatory parameters: Volume Controlled Ventilation (VCV) mode, low tidal volume 4 mL / kg (MV4) or 8 mL / kg (MV8) or 12 mL / kg (MV12), positive end-expiratory pressure (PEEP) of 0 cmH<sub>2</sub>O, respiratory rate: 70 bpm, 1: 2 I: E ratio and 21% inspired fraction of oxygen for 1 hour. During this experiment, ventilatory and hemodynamic parameters were monitored. At the end of the experiment, arterial blood, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue were collected for stereological and biochemical analyses. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 5.00. Data were expressed as mean ± standard error of the mean and the significant difference was considered when  $p < 0.05$ . As a result, high tidal volume MV promoted an increase in neutrophil influx in VM12 compared to CG, VM4 and VM8 in BAL. In pulmonary homogenate, we observed an increase in CCL5, TNF, IL-1 and IL-6 levels in VM12 compared to CG and VM4. The biochemical parameters showed an increase in the superoxide dismutase (SOD) activity in MV12 compared to CG and MV4. In relation to catalase (CAT) activity, there was an increase in MV12 compared to CG. The damage in lung parenchyma was evaluated by oxidation of proteins and lipid peroxidation, there was an increase of lipid peroxidation in MV12 compared to CG, MV4 and MV8, as well as an increase of oxidation of proteins in MV12 compared to CG and MV4. For stereological analyses, there was an increase of volume density of alveolar space ( $V_v [a]$ ) in MV12 compared to CG and MV4. However, there was a decrease in the volume density of alveolar septa ( $V_v [sa]$ ) in MV12 compared to CG and MV4. In the analysis of arterial blood gases, we observed that  $PCO_2$  (mmHg) in MV12 was lower than CG, MV4 and MV8. The parameter  $HCO_3^-$  was also lower in MV12 compared to CG, MV4 and MV8. Regarding  $PO_2$  (mmHg), there was a decrease in VM4 compared to CG. Our results showed that the high tidal volume promoted acute pulmonary inflammation and redox imbalance in healthy adult rats submitted to mechanical ventilation for a short period.

Keywords: mechanical ventilation, high tidal volume, oxidative stress, pulmonary inflammation.

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

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Sistema respiratório.....  | 21 |
| <b>Figura 2.</b> Estrutura alveolar .....   | 22 |
| <b>Figura 3.</b> Centros respiratórios .....  | 24 |
| <b>Figura 4.</b> Fases do ciclo ventilatório .....                                  | 26 |
| <b>Figura 5.</b> Curvas dos modos ventilatórios .....                               | 27 |
| <b>Figura 6.</b> Protótipo de ventilador mecânico patenteado por Alfred Jones ..... | 29 |
| <b>Figura 7.</b> Pacientes sendo ventilados durante epidemia da poliomielite .....  | 30 |
| <b>Figura 8.</b> Ventilador mecânico moderno (Modelo Servo-s - Maquet) .....        | 32 |
| <b>Figura 9.</b> Cascata da inflamação .....  | 34 |
| <b>Figura 10.</b> Formação das espécies reativas de oxigênio.....                   | 35 |
| <b>Figura 11.</b> Análises estereológicas.....                                      | 58 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Curva padrão albumina.....                                   | 44 |
| <b>Tabela 2.</b> Reagentes utilizados para mensurar a atividade da SOD.....   | 45 |
| <b>Tabela 3.</b> Parâmetros hemodinâmicos. ....                               | 51 |
| <b>Tabela 4.</b> Função pulmonar. ....  | 52 |
| <b>Tabela 5.</b> Análises gasométricas. ....                                  | 53 |
| <b>Tabela 6.</b> Parâmetros hematológicos. ....                               | 54 |
| <b>Tabela 7.</b> Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA. ....      | 55 |
| <b>Tabela 8.</b> Análise das citocinas inflamatórias no tecido pulmonar. .... | 56 |
| <b>Tabela 9.</b> Análise do estresse oxidativo no tecido pulmonar. ....       | 57 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ATP:** Adenosina trifosfato  
**BHT:** Butil hidróxitolueno  
**BR:** Brasil  
**BPM:** Batimento por minuto  
**BSA:** Albumina bovina  
**Carb:** Carbonilada  
**CAT:** Catalase  
**CCA:** Centro de Ciência Animal  
**CCL5:** Ligante do receptor de quimiocina CC5  
**CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais  
**CO<sub>2</sub>:** Gás carbônico  
**cm:** Centímetro  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**DNA:** Ácido desoxiribonucléico  
**DNPH:** 2,4- difenilhidrazina  
**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
**FC:** Frequência cardíaca  
**FIO<sub>2</sub>:** Fração inspirada de oxigênio  
**FR:** Frequência respiratória  
**ERO:** Espécie Reativa de Oxigênio  
**GC:** Grupo controle  
**Gpx:** Glutaciona peroxidase  
**GSH:** Glutaciona reduzida  
**GSSG:** Glutaciona oxidada  
**HE:** Hematoxilina e Eosina  
**HCl:** Ácido clorídrico  
**HCO<sub>3</sub>-:** Bicarbonato  
**H<sub>2</sub>O:** Água  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogênio  
**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Ácido sulfúrico  
**HTAB:** Brometo de hexadeciltrimetilamônio  
**I:E:** Relação inspiração expiração

**IL-1:** Interleucina 1

**IL-6:** Interleucina 6

**irpm:** incursões respiratórias por minuto

**LBA:** Lavado broncoalveolar

**LIMP:** Laboratório de Imunopatologia

**LPIV:** Lesão pulmonar induzida pelo ventilador

**MPO:** Mieloperoxidase

**MTT:** Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H] - 2,5-diferenilterazolio

**NUPEB:** Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

**O<sub>2</sub>:** Oxigênio

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Ânion superóxido

**PAM:** Pressão arterial média

**PAP:** Pressão arterial pulsátil

**PBS:** Solução salina fosfatada

**PE:** Polietileno

**PEEP:** Positive end-expiratory pressure

**pCO<sub>2</sub>:** Pressão parcial de gás carbônico

**PCV:** Modo ventilação por pressão controlada

**pH:** Potencial hidrogeniônico

**pO<sub>2</sub>:** Pressão parcial de oxigênio

**PSV:** Modo ventilação por pressão de suporte

**PTN:** Proteína

**RPM:** Rotações por minuto

**SO<sub>2</sub>:** Saturação de oxigênio

**SOD:** Superóxido dismutase

**TBARS:** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TBA:** Ácido tiobarbitúrico

**TCA:** Ácido tricloroacético

**TMB:** Tetrametilbenzidina

**TNF $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral  $\alpha$

**UFOP:** Universidade Federal de Ouro Preto

**UTI:** Unidade de terapia intensiva

**VC:** Volume corrente

**VCV:** Modo ventilação por volume controlado

**VM:** Ventilação Mecânica

**V<sub>min</sub>:** Volume minuto

**Vv[a]:** Densidade de volume de espaço alveolar

**Vv[sa]:** Densidade de volume de septo alveolar

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 18 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....  | 20 |
| 2.1 Anatomia e fisiologia do sistema respiratório .....                       | 20 |
| 2.2 A ventilação mecânica .....   | 25 |
| 2.3 A ventilação mecânica ao longo da história .....                          | 28 |
| 2.4 A inflamação e o estresse oxidativo .....                                 | 33 |
| 3. JUSTIFICATIVA .....  | 37 |
| 4. OBJETIVOS .....  | 38 |
| 4.1 Objetivo geral .....  | 38 |
| 4.2 Objetivos específicos .....   | 38 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 39 |
| 5.1 Animais .....   | 39 |
| 5.2. Grupos experimentais .....   | 39 |
| 5.3 Monitorização cardiovascular .....  | 40 |
| 5.4 Ventilação espontânea .....   | 40 |
| 5.5 Ventilação mecânica .....   | 41 |
| 5.6 Coleta do sangue .....  | 41 |
| 5.7 Eutanásia .....   | 42 |
| 5.8 Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA) .....                     | 42 |
| 5.9 Processamento do tecido pulmonar e homogeneização .....                   | 43 |
| 5.10 Biomarcadores de estresse oxidativo e dano .....                         | 43 |
| 5.10.1 Proteínas totais .....   | 43 |
| 5.10.2 Atividade da Superóxido dismutase (SOD) .....                          | 44 |
| 5.10.3 Atividade da Catalase (CAT) .....                                      | 45 |
| 5.10.4 Dosagem das substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) ..... | 46 |
| 5.10.5 Proteína Carbonilada .....   | 46 |
| 5.11 Mieloperoxidase (MPO) .....  | 47 |
| 5.12 Ensaio imunoenzimático para marcadores inflamatórios .....               | 48 |
| 5.13 Análises estereológicas do tecido pulmonar .....                         | 49 |
| 5.14 Análises estatísticas .....  | 49 |
| 6. RESULTADOS .....   | 51 |

|   |    |
|---|----|
| 6.1 Parâmetros hemodinâmicos .....                              | 51 |
| 6.2 Função pulmonar .....                                       | 51 |
| 6.3 Análises gasométricas .....                                 | 52 |
| 6.4 Parâmetros hematológicos .....                              | 53 |
| 6.5 Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA .....     | 54 |
| 6.6 Análise bioquímica de danos e estresse oxidativo .....      | 56 |
| 6.7 Análise de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar ..... | 55 |
| 6.8 Análises estereológicas .....                               | 57 |
| 7. DISCUSSÃO .....  | 59 |
| 8. CONCLUSÃO .....  | 66 |
| REFERÊNCIAS .....   | 67 |
| ANEXOS .....  | 79 |
| Anexo 1. Certificado de Aprovação do CEUA .....                 | 79 |
| Anexo 2. Certificado de apresentação de pôster .....            | 80 |
| Anexo 3. Certificado de Menção Honrosa .....                    | 81 |

## 1. INTRODUÇÃO

A Ventilação Mecânica (VM) é uma ferramenta hospitalar de grande importância utilizada no tratamento de pacientes com insuficiência respiratória aguda ou crônica agudizada. A literatura tem demonstrado que a utilização da VM pode causar uma forma de lesão pulmonar iatrogênica em pacientes sem comprometimento pulmonar prévio denominada de lesão pulmonar induzida pelo ventilador (LPIV). A LPIV está associada a uma alta taxa de mortalidade e tem um importante impacto social. Os mecanismos relacionados com a LPIV incluem o atelectrauma (trauma relacionada com a distensão e colapso cíclico dos alvéolos), o barotrauma (trauma pela pressão), o volutrauma (dano causado por alto volume corrente) ou biotrauma (alterações inflamatórias pulmonares e sistêmicas decorrentes de repetidas lesões celulares induzidas pela ventilação). Dessa forma, o ajuste cuidadoso dos parâmetros ventilatórios é de extrema importância, visto que uma regulação inadequada do volume corrente pode ocasionar efeitos nocivos ao organismo, como alterações celulares e aumento do metabolismo anaeróbico.

Embora os mecanismos responsáveis pela formação da LPIV não estejam totalmente compreendidos, já é sabido que a utilização de altos volumes correntes pode causar danos às células epiteliais alveolares e o aumento na permeabilidade vascular, o que está associado ao recrutamento de leucócitos para o espaço aéreo. Uma vez ativados no espaço alveolar, os leucócitos especificamente os neutrófilos, podem então contribuir para o processo inflamatório local desencadeado por diversas vias que incluem a secreção de proteases, a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio, citocinas e outros mediadores inflamatórios. A literatura vem sugerindo que a ventilação mecânica com alto volume corrente desencadeia um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes presentes no tecido pulmonar, o que ocasiona uma desordem metabólica conhecida como estresse oxidativo. No intuito de manter a homeostase redox celular, o organismo conta com sistemas de defesa biológica específicos, incluindo as enzimas catalase, superóxido dismutase e o sistema glutatona para combater o estresse oxidativo.

Diante do exposto, compreender os possíveis efeitos da VM sobre o processo inflamatório e estresse oxidativo possibilitará uma melhor compreensão do melhor volume corrente a ser ajustado pelos profissionais da saúde que lidam diariamente

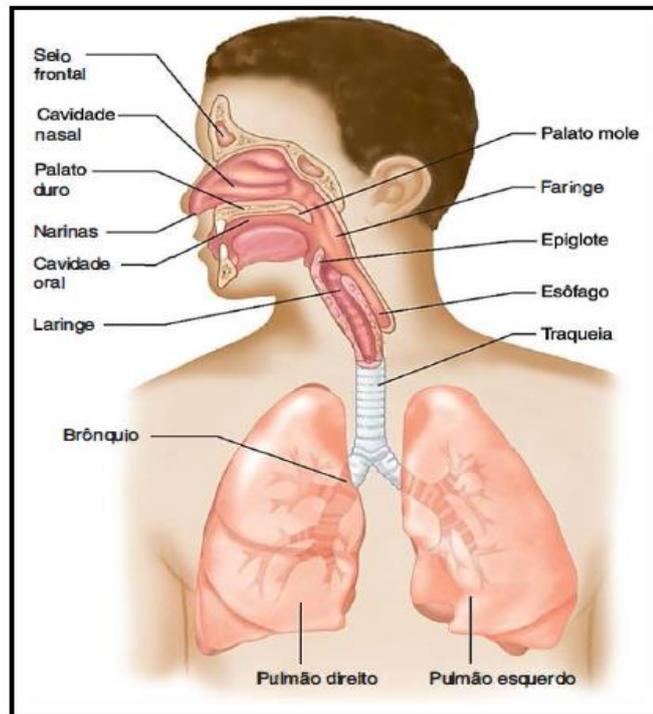
com a ventilação mecânica, e assim, evitar e/ou minimizar os agravamentos locais e sistêmicos induzidos pela VM, bem como auxiliar na elaboração de protocolos ventilatórios, minimizando possíveis lesões secundárias à VM e, conseqüentemente, diminuindo o tempo de internação hospitalar e mortalidade. Para isso, o presente estudo objetivou analisar os possíveis efeitos da ventilação mecânica com diferentes volumes correntes sobre o desequilíbrio redox e resposta inflamatória pulmonar em ratos Wistar saudáveis.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Anatomia e fisiologia do sistema respiratório

O sistema respiratório é responsável por proporcionar ao indivíduo uma maneira de repor o oxigênio ( $O_2$ ) e eliminar o gás carbônico ( $CO_2$ ) presentes na corrente sanguínea. Essa dinâmica troca de gases que ocorre entre o pulmão e o sangue é resultante de alguns processos, dos quais podemos destacar: a ventilação e a difusão (POWERS; HOWLEY, 2005). A ventilação consiste no deslocamento do fluxo aéreo para dentro e para fora dos pulmões (JANSSENS; PACHE; NICOD, 1999). Já a difusão refere-se ao movimento das moléculas de uma área de alta concentração para outra de menor concentração (WEST, 2013). O sistema respiratório humano é composto por um grupo de passagens que transportam e filtram o ar até o interior dos pulmões, no interior pulmonar existem microscópicos sacos aéreos denominados de alvéolos, onde ocorrem às trocas gasosas (DANGELO; FATTINI, 2003; POWERS; HOWLEY, 2005). Didaticamente, o sistema respiratório pode ser dividido em duas zonas funcionais: a zona condutora e a zona respiratória (PATWA; SHAH, 2015). A zona condutora inclui todas as estruturas anatômicas através das quais o ar passa até chegar à zona respiratória, a região pulmonar onde ocorrem as trocas gasosas é denominada zona respiratória e inclui os bronquíolos respiratórios e os sacos alveolares (Figura 1) (DEMPSEY; FREGOSI, 1985; JANSSENS; PACHE; NICOD, 1999).

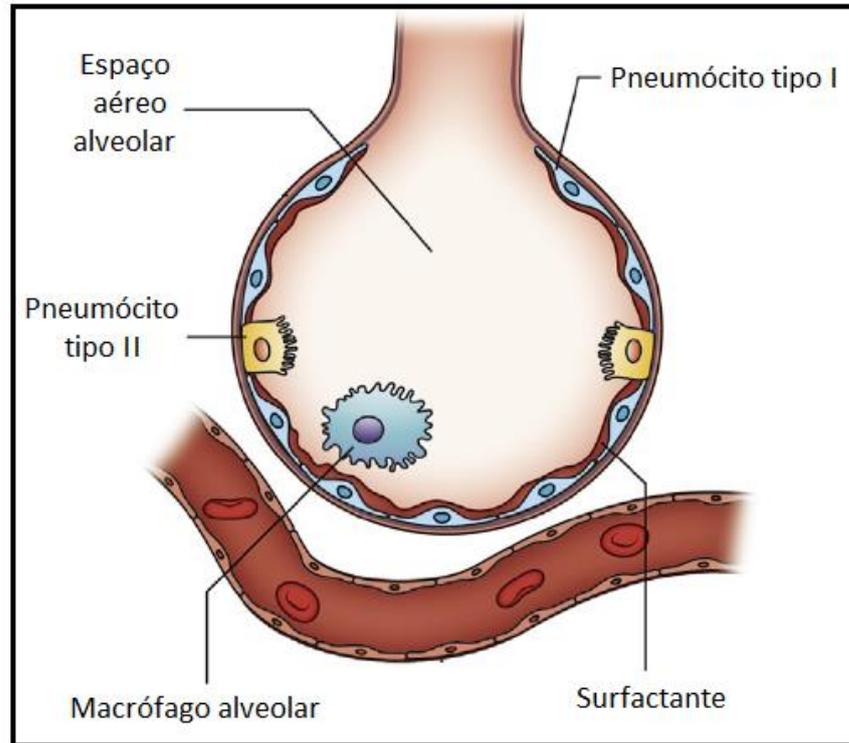
As trocas gasosas ocorrem através das paredes de cerca de 500 milhões de alvéolos pulmonares e/ou bronquíolos respiratórios (HAITSMA, 2007). O enorme número dessas estruturas confere ao pulmão uma ampla área de superfície para difusão (POWERS; HOWLEY, 2005). Estima-se que a área de superfície total disponível para difusão no pulmão humano seja de 50-100  $m^2$  (WEST, 2013). A taxa de difusão é favorecida pelo fato de os alvéolos possuírem uma única camada celular, de modo que a barreira hematogásica total tenha uma espessura de apenas duas camadas (GUYTON, 2008). O alvéolo é formado por células denominadas de pneumócitos tipo I que conferem estrutura e pneumócitos tipo II que são responsáveis pela produção do surfactante, provendo diminuição da tensão superficial e evitando o colapso dos alvéolos (Figura 2) (POWERS; HOWLEY, 2005).



**Figura 1.** Sistema respiratório. **Fonte:** Adaptado de Powers e Howley, 2005.

O pulmão é um órgão projetado para que nele aconteçam as trocas gasosas por meio da difusão, nesse processo fisiológico ocorre o intercâmbio dos gases por meio da membrana alveolar-capilar (GARTNER; HIATT, 2002). A difusão de um gás através dos tecidos é descrita pela lei da difusão de Fick, essa lei estabelece que a velocidade de transferência gasosa é proporcional à área tecidual, ao coeficiente de difusão do gás e à diferença existente entre as pressões parciais do gás em ambos os lados do tecido, sendo inversamente proporcional à espessura. Em termos simples, a taxa de difusão é maior quando a área de superfície para difusão é ampla e a pressão direcionadora entre ambos os lados do tecido é alta. Em contraste, um aumento ou alterações na espessura do tecido impede a difusão dos gases (WEST, 2013). A pressão parcial de gás carbônico ( $PCO_2$ ) e a pressão parcial de oxigênio ( $PO_2$ ) do sangue que entram nos pulmões equivalem a cerca de 46 e 40 mmHg, respectivamente, em contraste, a  $PCO_2$  e a  $PO_2$  no gás alveolar giram em torno de 40 e 105 mmHg, respectivamente. Como consequência da diferença de pressão parcial ao longo da interface hematogásica, o  $CO_2$  deixa o sangue e se difunde para dentro dos alvéolos, enquanto o  $O_2$  se difunde do interior dos alvéolos para o sangue

circulante. O sangue que sai dos pulmões exibe uma  $PO_2$  aproximada de 95 mmHg e uma  $PCO_2$  de 40 mmHg (POWERS; HOWLEY, 2005; GUYTON, 2008).

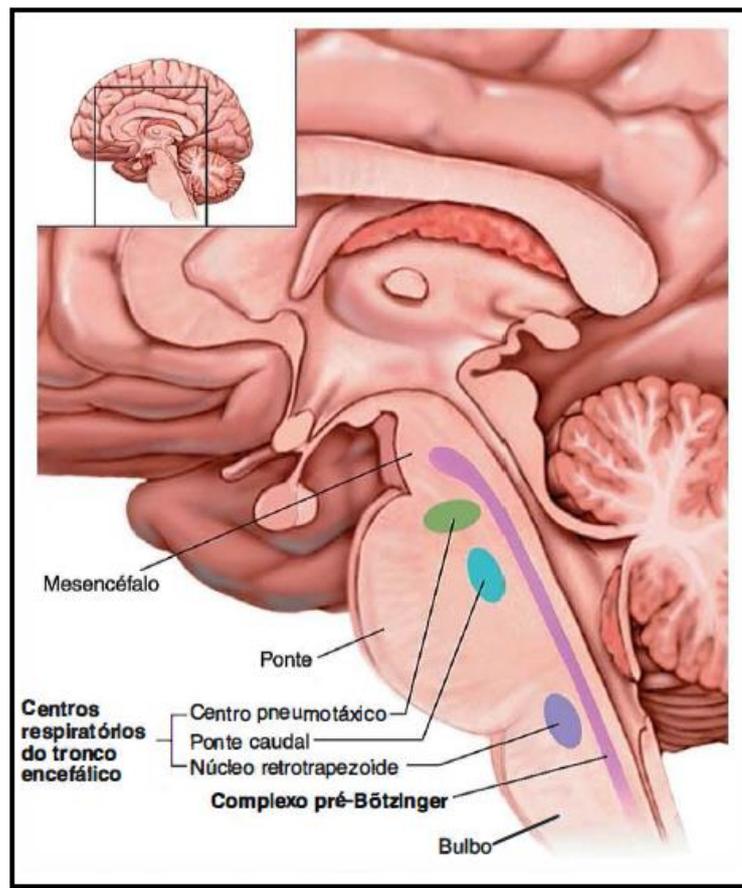


**Figura 2.** Estrutura alveolar. **Fonte:** Adaptado de Curley *et al.*, 2016.

Para que os gases cheguem aos alvéolos, é necessário que ocorra o movimento do fluxo aéreo dentro do sistema respiratório. Esse movimento é realizado por meio da contração da musculatura respiratória (POWERS *et al.*, 1990). A inspiração, primeira fase do ciclo ventilatório, é produzida principalmente pela contração do músculo diafragma e músculos auxiliares, já a expiração, segunda fase do ciclo ventilatório, ocorre pelo relaxamento dos músculos ventilatórios (KOEPPEN; STANTON; BERNE; LEVY, 2009). O diafragma é o músculo mais importante para a inspiração, sendo considerado um músculo essencial para a manutenção da vida (KAVAZIS *et al.*, 2007). Esse músculo delgado e em forma de cúpula se insere nas costelas inferiores e é inervado pelo nervo frênico (DANGELO; FATTINI, 2003). Quando se contrai, o diafragma aumenta a pressão intra-abdominal, além disso, ocorre a elevação das costelas pela contração dos músculos intercostais externos (KOEPPEN; STANTON; BERNE; LEVY, 2009). O resultado dessas duas ações é a diminuição da pressão intrapleurar que, por sua vez, causa a expansão dos pulmões.

Essa expansão acarreta uma diminuição da pressão intrapulmonar a níveis inferiores à pressão atmosférica, o que possibilita a entrada do fluxo de ar para dentro dos pulmões (GUYTON, 2008). A expiração é passiva durante a respiração normal e tranquila, ou seja, em repouso, nenhum esforço muscular é necessário para que a expiração ocorra (POWERS; HOWLEY, 2005). Isso ocorre porque os pulmões e as paredes torácicas são elásticas e voltam à posição de equilíbrio após se expandirem durante a inspiração (POWERS *et al.*, 1990; KAVAZIS *et al.*, 2007).

Durante o processo de inspiração e expiração ocorre a expansão e retração do tórax decorrente do movimento do fluxo aéreo (KOEPPEN; STANTON; BERNE; LEVY, 2009). A quantidade de ar deslocado a cada inspiração normal é denominada volume corrente (VC) (PATWA; SHAH, 2015). O produto do volume corrente pela frequência respiratória (FR) é denominado de volume minuto ( $V_{\min}$ ) (POWERS; HOWLEY, 2005). Considerando que o comportamento mecânico do pulmão é baseado em suas propriedades elásticas e em seu volume, a mensuração dos volumes pulmonares pode oferecer informações essenciais para a caracterização do estado fisiopatológico decorrente de anormalidades dos processos ventilatórios pulmonares. A contração e o relaxamento dos músculos ventilatórios são diretamente controlados pelos motoneurônios somáticos na medula espinal (PATWA; SHAH, 2015). A atividade neuronal motora, por sua vez, é diretamente controlada pelo centro de controle respiratório, no bulbo (SUZUE, 1984). A gênese da respiração advém dos disparos de vários aglomerados de neurônios localizados no interior do tronco encefálico, que atuam como marcapassos. Especificamente, o estímulo para a inspiração é oriundo de quatro centros de ritmo respiratório distintos localizados no bulbo e nas regiões de ponte do tronco encefálico (SMITH *et al.*, 2000; RAMIREZ *et al.*, 2013). Os centros geradores de ritmo medulares são chamados de complexo pré-Botzinger e núcleo retro trapezoide (FELDMAN; DEL NEGRO, 2006). Os centros geradores de ritmo localizados na ponte são compostos por dois aglomerados de neurônios denominados centro pneumotáxico e ponte caudal. O ritmo normal da respiração ocorre em razão da interação entre os neurônios marcapasso existentes em cada uma dessas regiões (FELDMAN; DEL NEGRO, 2006). Esses centros são responsáveis por controlar a quantidade de ar necessária para a manutenção da homeostase de cada indivíduo (Figura 3) (ST-JOHN; PATON, 2004; POWERS; HOWLEY, 2005).



**Figura 3.** Centros respiratórios. **Fonte:** Adaptado de Powers e Howley, 2005.

Para que o indivíduo mantenha suas condições vitais é fundamental que todo esse complexo sistema esteja em perfeito equilíbrio e funcionamento. Entretanto, em algumas situações esse complexo sistema pode “falhar” e ser necessária alguma ferramenta que garanta que todo esse processo seja substituído e restabelecido (DONAHOE, 2006; BARBAS *et al.*, 2014). Atualmente podemos contar com a ventilação mecânica artificial por pressão positiva para garantir que essas demandas metabólicas sejam mantidas (CARVALHO; JUNIOR; FRANCA, 2007; HAITSMAN, 2007; BARBAS *et al.*, 2014).

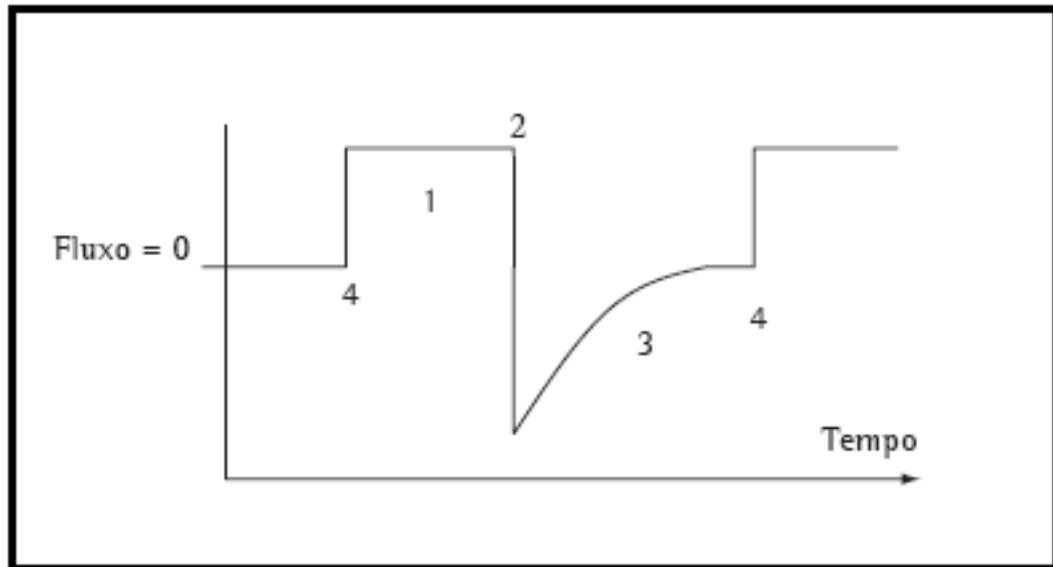
## 2.2 A ventilação mecânica

A VM consiste em um método que oferece ao paciente suporte ventilatório adequado em condições de insuficiência respiratória (AHMED; DANIEL MARTIN; SMITH, 2019). A VM pode ser classificada como invasiva quando é introduzida através de uma prótese ventilatória (traqueostomia ou tubo orotraqueal) na via aérea do paciente e não-invasiva quando utilizada com uma interface (máscara) entre o paciente e o aporte ventilatório (CARVALHO; JUNIOR; FRANCA, 2007). Os aparelhos de ventilação mecânica insuflam os pulmões com volumes de ar, em uma determinada velocidade, gerando assim pressões positivas (pressão inspiratória e pressão expiratória) na via aérea (CARLOS TOUFEN JUNIOR, 2007). A VM tem como objetivo a manutenção das trocas gasosas, amenizar o trabalho muscular, reverter ou evitar a fadiga da musculatura ventilatória, diminuir o consumo de oxigênio e permitir a aplicação de terapêuticas específicas (CARVALHO; JUNIOR; FRANCA, 2007; ROTTA; STEINHORN, 2007; POWERS; WIGGS; SOLLANEK; SMUDER, 2013).

A aplicação da ventilação mecânica é uma parte importante do cuidado de muitos pacientes graves, é principalmente fornecida dentro do ambiente hospitalar e, especialmente, nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (DAMASCENO, 2006). Os pacientes submetidos a esse tipo de tratamento devem ser constantemente avaliados e monitorados pela equipe multiprofissional, já que as alterações fisiopatológicas das doenças se modificam constantemente e, com isso, há necessidade de ajustes ventilatórios. Além disso, a utilização da ventilação mecânica pode estar associada a algumas complicações, como, por exemplo, a lesão induzida pela ventilação mecânica, depressão cardiovascular, efeitos deletérios em outros órgãos e barotrauma que é o dano causado por pressão (RICARD; DREYFUSS; SAUMON, 2003; DEL SORBO; SLUTSKY, 2010; GATTINONI; PROTTI; CAIRONI; CARLESSO, 2010).

Para aplicar a ventilação mecânica de modo seguro é importante que o profissional possua um entendimento na área de fisiologia humana e sobre os princípios básicos de funcionamento do ventilador mecânico, assim, é possível evitar lesões e danos aos indivíduos submetidos ao suporte ventilatório (MASOUMI *et al.*, 2017; SCHONHOFER, 2018). Durante a utilização da ventilação artificial, o ciclo ventilatório pode ser dividido didaticamente em quatro fases: 1) fase inspiratória: insuflação dos pulmões; 2) ciclagem: mudança da fase inspiratória para a fase expiratória; 3) fase

expiratória: fase de desinsuflação pulmonar passiva e 4) fase de disparo: mudança da fase expiratória para a fase inspiratória (Figura 4) (CARVALHO; JUNIOR; FRANCA, 2007; GENTILE, 2011).

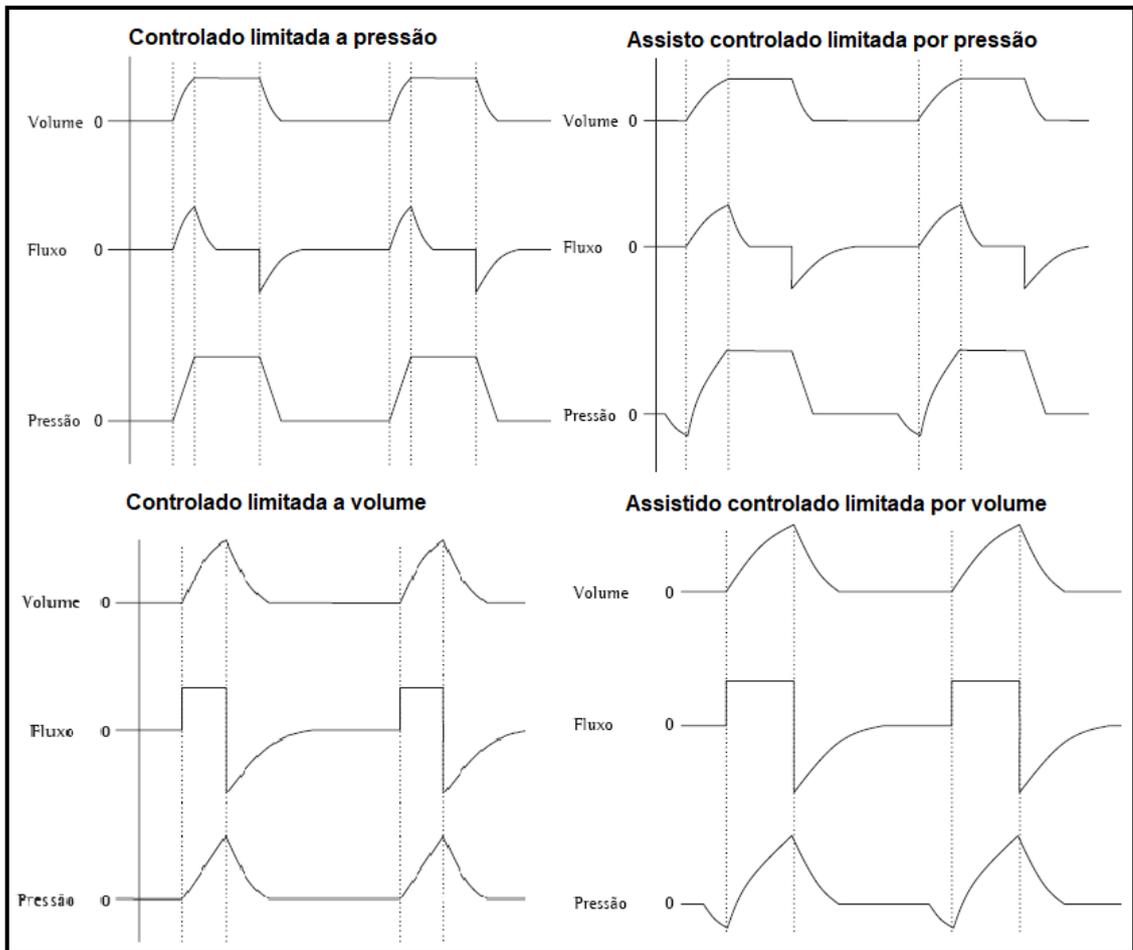


**Figura 4.** Fases do ciclo ventilatório: VCV. **Fonte:** Adaptado de Carvalho *et al.*, 2007.

A partir do entendimento básico do funcionamento do ventilador é possível compreender como o respirador participa do ciclo ventilatório (CARLOS TOUFEN JUNIOR, 2007). O modo ventilatório é definido pela integração das variáveis das fases do ciclo ventilatório associada às características do ventilador escolhido, além do conhecimento da fisiopatologia apresentada pelo paciente que levou à necessidade do suporte ventilatório (KALLET *et al.*, 2000; GURSEL; AYDOGDU, 2009). Na literatura ainda há divergências entre as definições de modo ou modalidades ventilatórias, dessa maneira, cabe ao profissional tentar identificar quais os melhores ajustes para cada paciente (CAMPBELL; DAVIS, 2002; CHACKO *et al.*, 2015; GHABACH *et al.*, 2017). Alguns autores utilizam a definição de modo ventilatório a partir de como o ciclo ventilatório é iniciado (EPSTEIN, 2001), o modo de ventilação também se relaciona à forma de interação entre o paciente e o ventilador, ao grau de participação do paciente em sua própria ventilação e à forma de administração dos parâmetros pelo ventilador (EPSTEIN, 2001; BARBAS *et al.*, 2014).

Para o suporte ventilatório ser ofertado ao paciente é necessário ajustar o modo ventilatório, existem três modos que são conhecidos como modos básicos, esses

incluem a ventilação controlada por volume (VCV), a ventilação controlada por pressão (PCV) e a ventilação por pressão de suporte (PSV) (PRELLA; FEIHL; DOMENIGHETTI, 2002). O modo controlado é uma modalidade de ventilação em que os ciclos ventilatórios são comandados e fornecidos pelo ventilador, tendo como parâmetros pré-determinados: frequência respiratória, pressão ou volume, fluxo inspiratório e tempo inspiratório (GENTILE, 2011). Quando o disparo ocorre de acordo com pressão negativa ou fluxo positivo realizados pelo paciente é denominado como modo assistido/controlado (Figura 5) (CARVALHO; JUNIOR; FRANCA, 2007; BARBAS *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Curvas dos modos ventilatórios. **Fonte:** Adaptado de Carvalho *et al.*, 2007.

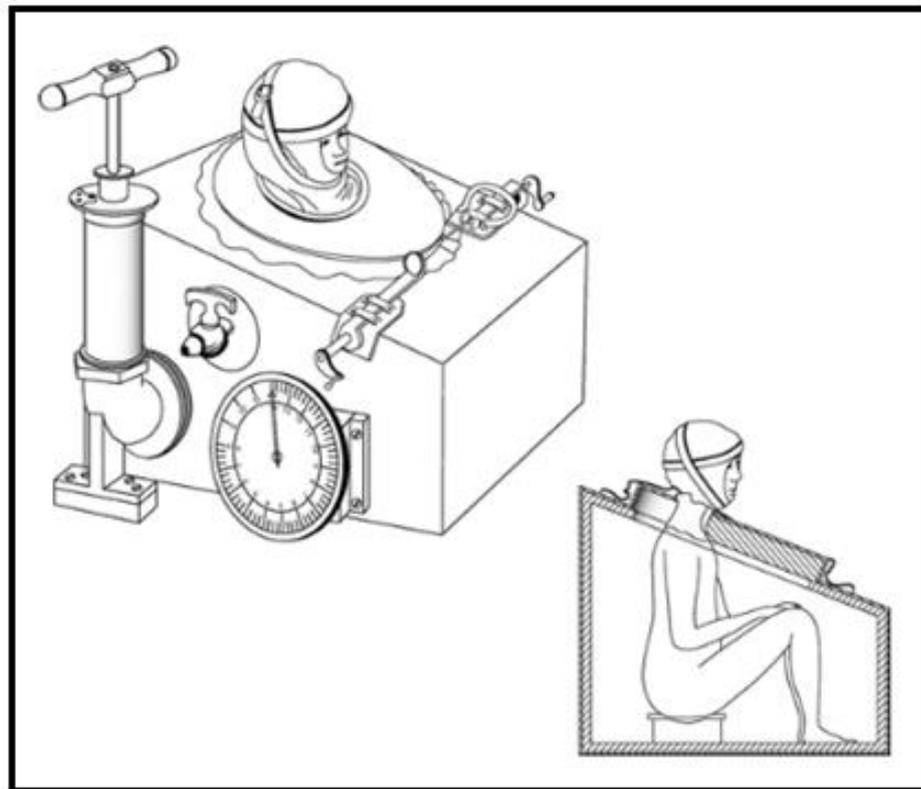
Como descrito anteriormente, um dos principais objetivos da ventilação mecânica é efetuar um intercâmbio gasoso eficaz, promovendo a eliminação de gás carbônico e a captação de oxigênio (KOH, 2007; PETTENUZZO; FAN, 2017). Devemos lembrar

que os parâmetros variam de acordo com a idade do paciente, peso e com a doença de base, sendo necessários ajustes específicos para cada indivíduo (BARBAS *et al.*, 2014). Dessa maneira, para instituir a ventilação mecânica nos pacientes que apresentem necessidade de suporte ventilatório a equipe deverá decidir as melhores configurações, melhor modo de entrega do ventilador mecânico para cumprir as necessidades do indivíduo de maneira que evite danos e lesões pulmonares (SLUTSKY, 2010; DE WIT, 2011; DEL SORBO; BARBAS *et al.*, 2014).

### **2.3 A ventilação mecânica ao longo da história**

Atualmente a ventilação mecânica auxilia no tratamento de pacientes com diversas patologias sendo considerada uma ferramenta indispensável para manter o organismo vivo (BROWER *et al.*, 2000). Historicamente, pensadores cientistas auxiliaram de uma forma muito importante no desenvolvimento do conceito da ventilação mecânica ao longo dos anos, por exemplo, Galeno, no século II, desempenhou um papel importante na introdução da anatomia para a compreensão de diversas doenças (STERNBACH *et al.*, 2001), posteriormente, Vesalius no ano de 1543 publicou um tratado sobre anatomia que provavelmente teve a primeira referência definitiva à ventilação com pressão positiva como a conhecemos hoje. Ele descreveu que a vida poderia ser restaurada para um animal se uma abertura fosse realizada no tronco da traqueia (STERNBACH *et al.*, 2001; SLUTSKY, 2015). Robert Hook, em 1667, realizou um experimento para examinar a hipótese de Galeno de que o movimento dos pulmões era necessário para a circulação, ele usou foles para gerar um fluxo constante de gás na abertura das vias aéreas para os pulmões de cães (SLUTSKY, 2015). Já em 1744 foi iniciada a discussão sobre a ventilação mecânica causar danos ao indivíduo, John Fothergill publicou um ensaio no qual dizia que a força aplicada nos pulmões com o fole era grande e não poderia ser determinada, de forma que poderia causar danos, sugerindo a possibilidade de ferimentos causados pela ventilação e, em muitos aspectos, podemos vê-lo como o pai da lesão induzida por ventilação mecânica, graças as suas conclusões incrivelmente perspicazes desde aquela época. A discussão sobre os malefícios da ventilação continuou, em 1829, d'Etioles demonstrou que o uso de foles para ventilação podia causar pneumotórax, levando à morte (SLUTSKY, 2015). Diante desse cenário, a busca por ferramentas

que garantisse condições de ventilação era incessante, e em 1864, Alfred Jones inventou um dos primeiros dispositivos por pressão negativa. Esses ventiladores envolviam o corpo do indivíduo, nele o paciente sentava-se em uma caixa que cercava totalmente o corpo do pescoço para baixo. Nele havia um êmbolo que era usado para diminuir a pressão na caixa, o que causava inalação e o inverso produzia exalação (Figura 6) (KACMAREK, 2011). Em 1929, um professor da Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard chamado Dr. Cecil Drinker e seu irmão Philip Drinker desenvolveram o ventilador tanque por pressão negativa, que se tornou conhecido como o "pulmão de aço" (CHEN; STERNBACH; FROMM; VARON, 1998; GEDDES, 2007).



**Figura 6.** Protótipo de ventilador mecânico patenteado por Alfred Jones. **Fonte:** Slutsky, 2015.

Em 1952, houve uma epidemia de poliomielite em Copenhague, no auge dessa epidemia 50 pacientes por dia estavam sendo internados no Hospital *Blegdams Infectious Disease*, muitos com paralisia muscular ou bulbar ventilatória (STERNBACH *et al.*, 2001). Devido ao grande número de internações, haviam disponíveis apenas alguns aparelhos de ventilação por pressão negativa, portanto, a

mortalidade dos pacientes era extremamente elevada, maior que 80% (LASSEN, 1953). Na tentativa de reverter este alto índice, um médico anestesista submeteu os pacientes a traqueostomia e os ventilou com um ressuscitador manual, e a partir desta demonstração essa forma de ventilação invasiva por pressão positiva tornou-se o tratamento padrão para a poliomielite, e cerca de 1.500 estudantes revezavam na ventilação manual dos pacientes, dessa forma, a mortalidade caiu consideravelmente, de 87% para 40%, e essa logística para a abordagem de muitos pacientes em um mesmo local levou a criação das primeiras UTIs (Figura 7) (LASSEN, 1953; CHEN; STERNBACH; FROMM; VARON, 1998; KACMAREK, 2011; SLUTSKY, 2015).



**Figura 7.** Pacientes sendo ventilados durante epidemia da poliomielite. **Fonte:** Kacmarek, 2011.

Posteriormente, em 1957, o engenheiro aeronauta e médico Forrest Bird criou o Bird Mark-7, considerado o primeiro ventilador mecânico invasivo à pressão positiva fabricado em larga escala (SOMERSON; SICILIA, 1992; KACMAREK, 2011). À medida que o uso da ventilação mecânica se espalhou, tornou-se evidente que os primeiros ventiladores eram menos eficazes na manutenção das trocas gasosas, e isso, combinado aos avanços tecnológicos e à experiência de alguns estudiosos da

época, levou ao uso predominante da ventilação com pressão positiva (KACMAREK, 2011; SLUTSKY, 2015). Os ventiladores com pressão positiva permitiam aplicar maiores pressões, o que os tornava mais eficientes em facilitar as trocas gasosas, entretanto, alguns estudiosos da época já sinalizavam para um dano causado devido ao aumento da pressão através das membranas alveolares e dos volumes pulmonares elevados (MACKLIN; MACKLIN, 1944; SLUTSKY, 2015). Nos anos seguintes, as pesquisas relacionavam os danos da ventilação com uso de alta fração inspirada de oxigênio ( $FIO_2$ ) em estudos com animais, demonstrando um aumento significativo na mortalidade dos animais ventilados com  $FIO_2$  de 100% (WEBB; TIERNEY, 1974; STAEHR-RYE *et al.*, 2017). Diante dessa situação, na década de 60, os médicos evitavam utilizar alta  $FIO_2$  e optavam por utilizar altos volumes correntes, principalmente durante as cirurgias (DELLA ROCCA; COCCIA, 2013; GATTINONI *et al.*, 2017). Essa estratégia temporariamente melhorava a hipoxemia, mas, ao longo do tempo gerava lesão pulmonar em muitos pacientes (ZIMMERMAN; DUNBAR; KLINGENMAIER, 1975). Como exemplo dessa situação, um grupo de pesquisadores publicaram um resumo na década de 70, no qual descreviam que aproximadamente 40% dos pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo ventilados com pressão positiva expiratória final (PEEP) de 16 cmH<sub>2</sub>O e VC de 22 mL/kg desenvolveram barotrauma grave e problemas causados pelo estresse físico que por sua vez estaria associado às alterações inflamatórias na barreira alvéolo-capilar (WEBB; TIERNEY, 1974; ZIMMERMAN; DUNBAR; KLINGENMAIER, 1975; TREMBLAY; SLUTSKY, 1998; LICKER; FAUCONNET; VILLIGER; TSCHOPP, 2009).

Diante dos problemas causados pela ventilação houve a necessidade de criar novas perspectivas sobre a forma de ofertar o suporte ventilatório, essas mudanças permitiram criar ventiladores mais modernos, melhorar muitos aspectos técnicos, bem como melhorar os ventiladores mecânicos em relação ao fornecimento de fluxo, válvulas de exalação, uso de microprocessadores e desenvolvimento de novos modos de ventilação (Figura 8) (CARLOS TOUFEN JUNIOR, 2007; BARBAS *et al.*, 2014). Esse desenvolvimento tecnológico permitiu avanços, entretanto, ainda existe uma preocupação com o manejo correto de pacientes que necessitam utilizar a ventilação mecânica, por exemplo, um estudo realizado com médicos residentes nos Estados Unidos concluiu que os residentes não estavam adquirindo conhecimentos essenciais e necessários para fornecer atendimento eficaz e seguro aos pacientes que necessitavam de ventilação mecânica. No referido estudo, 48% dos entrevistados

responderam de forma incorreta sobre o uso do volume corrente apropriado para ventilar pacientes na síndrome do desconforto respiratório agudo (COX *et al.*, 2003; DENNISON *et al.*, 2007).

A literatura tem demonstrado que a utilização da ventilação mecânica com ajustes inadequados pode estar relacionada a graves problemas causados pelo estresse físico, que por sua vez, estariam associados às alterações inflamatórias na barreira alvéolo-capilar, produção de espécies reativas e, conseqüentemente, ao que tem sido descrito como estresse oxidativo (CURLEY, *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2017).



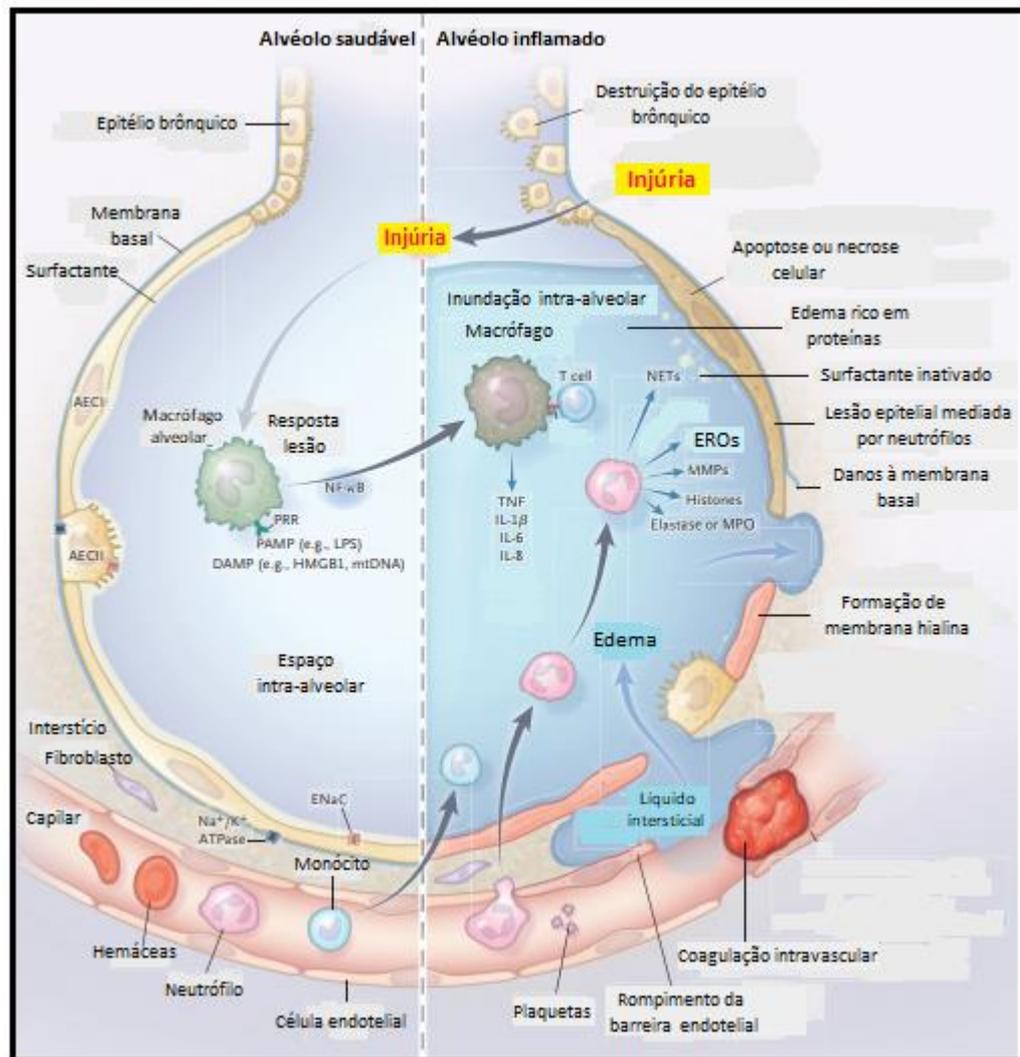
**Figura 8.** Ventilador mecânico moderno (Modelo Servo-s - Maquet). **Fonte:** MAQUET, 2019.

## 2.4 A Inflamação e o estresse oxidativo no pulmão

Estudos demonstraram que a utilização da ventilação mecânica pode induzir uma lesão pulmonar ou ainda agravar uma lesão pré-existente no paciente (DOS SANTOS; SLUTSKY, 2000; ANDRADE *et al.*, 2018). Dessa maneira, o ajuste correto dos parâmetros ventilatórios é de suma importância para evitar lesões causadas pela ventilação mecânica. Apesar de ser amplamente estudados, os mecanismos pelos quais a lesão pulmonar se desenvolve ainda não estão bem elucidados (DOS SANTOS; SLUTSKY, 2000; FRANK; MATTHAY, 2003). Alguns estudos demonstraram que a ventilação pode resultar em distensão dos alvéolos pulmonares, essa ação de forças mecânicas que agem sobre o parênquima pulmonar, pode conduzir a lesão de epitélio alveolar ou endotélio capilar, edema pulmonar, ativação de macrófagos alveolares, que liberam citocinas e quimiocinas levando ao recrutamento de neutrófilos (ABRAHAM, 2003; GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). Os neutrófilos por sua vez, liberam citocinas inflamatórias que favorecem a uma resposta inflamatória, uma vez ativados no espaço alveolar, os neutrófilos podem contribuir para o processo inflamatório desencadeado pela ventilação mecânica por diversas vias que incluem a secreção de proteases, citocinas inflamatórias e de espécies reativas de oxigênio (Figura 9) (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011; YILDIZ *et al.*, 2015; BEITLER; MALHOTRA; THOMPSON, 2016; THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017). Essa cascata de reações tem demonstrado desempenhar um papel importante na patogênese da LPIV (BELPERIO *et al.*, 2002; QUINN; MOUFARREJ; VOLOKHOV; HALES, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são encontradas em todos sistemas biológicos e têm origem no metabolismo do oxigênio molecular, em condições fisiológicas normais. As EROs são produzidas em células aeróbicas durante várias reações metabólicas endógenas por meio de um mecanismo conhecido como cadeia respiratória mitocondrial (LUSHCHAK, 2014; LUU *et al.*, 2015). O oxigênio sofre uma redução com aceitação de 4 elétrons, resultando na formação de água. Durante esse processo são formados intermediários reativos, tais como, os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (CASTELLO; COSTANTINI; SCALA, 2010; THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017; JÚNIOR; SOUZA; SANTOS; ANDRADE, 2019). As espécies reativas de oxigênio desempenham um papel importante na

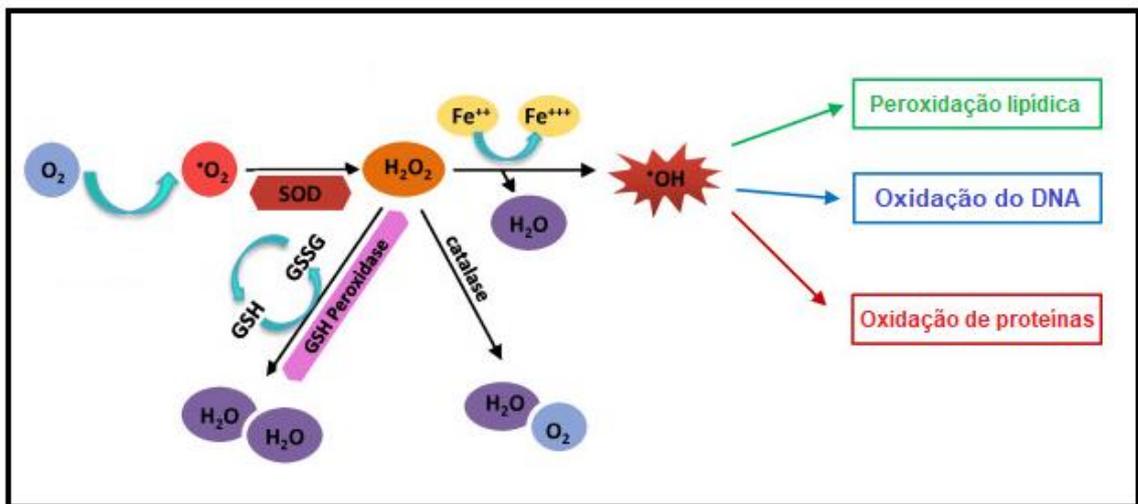
sinalização celular, proliferação celular, homeostase e indução de apoptose. Entretanto, em altas concentrações as espécies reativas de oxigênio produzem modificações adversas nos componentes celulares, como lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) (BIRBEN *et al.*, 2012; LUSHCHAK, 2014; LUU *et al.*, 2015).



**Figura 9.** Cascata da inflamação. **Fonte:** Adaptado de Thompson *et al.*, 2017.

Para evitar a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio existe o sistema de defesa antioxidante que tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pelas EROs. Usualmente, esse sistema é dividido em não-enzimático e enzimático (JÚNIOR; SOUZA; SANTOS; ANDRADE, 2019). O sistema não-enzimático é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem

endógena ou dietética. Já o sistema enzimático é composto por diversas enzimas que podem ser classificadas em sistema de defesa primário e secundário (BIRBEN *et al.*, 2012). As enzimas que compõem o sistema enzimático são a glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). A SOD é uma metaloenzima que catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Posteriormente, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser convertido em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ) pela atividade de CAT e GPx, a catalase reduz  $\text{H}_2\text{O}_2$  em duas moléculas de água e uma de oxigênio, já a glutathiona peroxidase catalisa a reação com oxidação de duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSG) (Figura 10) (CASTELLO, 2010; BARBOSA *et al.*, 2012).



**Figura 10.** Formação das espécies reativas de oxigênio. **Fonte:** Adaptado de Castello, 2010.

O desequilíbrio entre oxidante/antioxidante em favor dos oxidantes é denominado “estresse oxidativo”. Porém, atualmente tem-se uma definição mais abrangente para o termo "desequilíbrio redox", o qual se estabelece quando ocorre um aumento transitório ou persistente nos níveis das EROs, capaz de causar um distúrbio em vias de sinalização e levar a modificações oxidativas de constituintes celulares que, se não contrabalançadas, pode culminar na morte celular por meio de necrose ou apoptose (JONES, 2006; BINDOLI; RIGOBELLO, 2013; LUSHCHAK, 2014; FRIJHOFF *et al.*, 2015). Particularmente, os organismos aeróbicos utilizam seus sistemas antioxidantes integrados, que incluem antioxidantes enzimáticos e não

enzimáticos que são geralmente eficazes no bloqueio dos efeitos nocivos das EROs (BARBOSA; BRESSAN, 2010). No entanto, em condições fisiopatológicas, os sistemas antioxidantes podem ser sobrecarregados e favorecer ao que denominamos de desequilíbrio redox (LUSHCHAK, 2014). O desequilíbrio redox pode contribuir para muitas condições patológicas, incluindo o câncer, os distúrbios neurológicos, a aterosclerose, a hipertensão, a isquemia/perfusão, o diabetes, a síndrome do desconforto respiratório agudo, a fibrose pulmonar, a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a asma (ROSANNA; SALVATORE, 2012; CAMPOS *et al.*, 2017). A utilização da ventilação mecânica tem sido apresentada como um fator que desencadeia uma resposta inflamatória pulmonar causada por fatores biológicos, químicos e físicos, e, conseqüentemente, a superprodução das EROs (DUFLO *et al.*, 2002; HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2003).

### 3. JUSTIFICATIVA

A ventilação mecânica é uma ferramenta no suporte ventilatório de pacientes graves, entretanto, estudos demonstraram que a utilização da ventilação mecânica com alto volume corrente pode causar danos ao organismo. Os mecanismos que promovem esses danos ainda não são bem compreendidos, porém, o atelectrauma (trauma relacionada com a distensão e colapso cíclico dos alvéolos), o barotrauma (trauma pela pressão), o volutrauma (dano causado por alto volume corrente) ou biotrauma (alterações inflamatórias pulmonares e sistêmicas decorrentes de repetidas lesões celulares induzidas pela ventilação) podem ser termos chaves na compreensão do dano. Dessa maneira, o estudo dos efeitos da ventilação mecânica com diferentes volumes correntes torna-se de extrema relevância, uma vez que, possibilitará uma melhor compreensão do melhor volume corrente a ser ajustado pelos profissionais da saúde que lidam diariamente com a ventilação mecânica, e assim, evitar e minimizar os agravamentos locais e sistêmicos induzidos pela VM.

A diretriz de VM recomenda a utilização de volumes correntes entre 5 e 8 mL/kg, entretanto, na prática clínica em determinadas situações esses valores podem ser extrapolados para valores próximos a estes. Diante do exposto, acreditamos que o presente estudo utilizando um modelo experimental de ventilação mecânica em ratos saudáveis ventilados com alto volume corrente (12 mL/kg) possa causar inflamação pulmonar e desequilíbrio redox. Dessa maneira, esse estudo poderá contribuir para um maior esclarecimento dos efeitos dos diferentes volumes correntes, bem como para a elaboração de protocolos ventilatórios em humanos podendo gerar grande impacto econômico, uma vez que poderá melhorar a segurança do paciente, minimizando as lesões secundárias à VM e, conseqüentemente, diminuindo o tempo de internação hospitalar.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da ventilação mecânica com diferentes volumes corrente sobre o desequilíbrio redox e a resposta inflamatória pulmonar de ratos Wistar adultos saudáveis.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os parâmetros hemodinâmicos dos grupos experimentais;
- Analisar e comparar os parâmetros gasométricos;
- Determinar o influxo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar;
- Analisar biomarcadores do estresse oxidativo no homogenato pulmonar;
- Analisar e comparar os níveis de citocinas inflamatórias;
- Analisar o padrão histológico do parênquima pulmonar.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Trinta e dois ratos Wistar saudáveis machos, com idade entre 10 e 12 semanas, foram obtidos do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade ( $50 \pm 10\%$ ) e luminosidade (ciclo de 12 horas claro/escuro). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal estabelecidos pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e aprovados pelo protocolo número 2017/42.

### 5.2. Grupos experimentais

Inicialmente um experimento piloto seguindo o mesmo desenho experimental foi realizado para padronização das técnicas e dos métodos (dados não mostrados).

No presente estudo, os ratos foram divididos de forma randomizada em quatro grupos de oito animais cada, sendo que não houve diferença significativa no peso dos animais entre os grupos. Os grupos foram denominados da seguinte forma:

- GC (Grupo Controle): animais mantidos em ventilação espontânea;
- VM4: animais submetidos à ventilação mecânica com volume corrente de 4 mL/kg;
- VM8: animais submetidos à ventilação mecânica com volume corrente de 8 mL/kg;
- VM12: animais submetidos à ventilação mecânica com volume corrente de 12 mL/kg.

### 5.3 Monitorização cardiovascular

Os ratos foram anestesiados por 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), posicionados em decúbito dorsal em mesa cirúrgica, submetidos a uma incisão na região inguinal direita com o objetivo de localizar o feixe vâsculo-nervoso femoral, localizado esse feixe, a artéria e veia foram dissecadas e realizado um pequeno corte na artéria femoral direita, utilizando uma pinça oftálmica cateteres de polietileno (PE-10 conectado a PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) preenchidos com solução salina heparinizada (500 UI/mL) foram inseridos na artéria e veia femorais para medida da pressão arterial pulsátil (PAP) e infusão de solução fisiológica.

Após fixada, a cânula foi acoplada a um sistema computadorizado de aquisição de dados denominado Powerlab 4/35 que permite a avaliação da pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) através do registro direto da pressão arterial. Esse sistema contém um transdutor de pressão que conectado a um amplificador (ML221 Bridge Amp) que monitora a PAM. A PAP e FC foram continuamente mostradas por um sistema de conversão analógico/digital de 16 bits (Powerlab 4/35), a uma frequência amostral de 100 Hz e armazenados em disco rígido. A amplitude do *range* foi previamente definida em 20 mV. Posteriormente, o sinal foi processado por um software (Lab Chart 7) para se obter os dados, a PAM e FC foram derivadas em tempo real a partir de pulsos de PAP, utilizando o software Chart 5 (ADInstrumentsPtyLtd, Austrália). Essas variáveis foram apresentadas simultaneamente em canais distintos no monitor e armazenadas no disco rígido do computador (GOMES *et al.*, 2017; SA *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2018).

### 5.4 Ventilação espontânea

Os animais do grupo controle foram mantidos sob ventilação espontânea em ar ambiente. Para registro da função pulmonar, os animais desse grupo foram previamente ambientalizados a uma caixa hermeticamente fechada para adaptação prévia por 15 minutos. 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) por meio de pletismografia de corpo total, sendo expostos a ar medicinal (21% O<sub>2</sub> + 79% N<sub>2</sub> nominal; Medipure™ Medical Gases WHITE MARTINS) com um fluxo de (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.

### **5.5 Ventilação mecânica**

Para instituir a ventilação mecânica, ainda com os animais sedados, a traqueia foi canulada e conectada a um ventilador mecânico (Inspira, Advanced Safety Ventilator, Harvard/Aparelho Holliston, MA, EUA) em modo controlado por volume (VCV), volume corrente 4 mL/kg ou 8 mL/kg ou 12 mL/kg, PEEP de 0 cmH<sub>2</sub>O, frequência respiratória média de 70 bpm, relação I:E de 1:2 e fração inspirada de oxigênio de 21%, durante 60 minutos. Em todos animais submetidos à ventilação mecânica foi realizada a aplicação do bloqueador neuro muscular cloreto de suxametônio (1 mL/kg; Blau Farmacêutica, S.A., São Paulo, SP, BR) por via intravenosa (i.v.).

### **5.6 Coleta do sangue**

Ao final do procedimento experimental de ventilação mecânica (grupos VM4, VM8 e VM12) ou monitorização hemodinâmica (grupo controle), o tórax dos animais foi aberto para que o sangue arterial fosse coletado por meio de punção no ventrículo esquerdo. Duas alíquotas sanguíneas de cada animal foram coletadas, a primeira alíquota do sangue arterial foi imediatamente analisada no gasômetro (Nova Biomedical, Waltham, Massa, EUA) para avaliar a quantidade de gases sanguíneos, a outra alíquota sanguínea de 200 µL foi colocada em um tubo de polipropileno contendo 15 µL de heparina e encaminhada ao Laboratório de Imunopatologia (LIMP) - UFOP para a realização do Hemograma e Leucograma (ANDRADE *et al.*, 2018).

## 5.7 Eutanásia

Após a coleta do sangue os animais foram eutanasiados por sobre dose de sedativo. O lavado broncoalveolar e os pulmões foram coletados para posteriores análises que serão descritas a seguir.

## 5.8 Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)

A coleta do LBA foi realizada imediatamente após a eutanásia, já com o tórax aberto o pulmão esquerdo foi clampeado, a traqueia canulada e o pulmão direito foi lavado com 3 mL de solução salina gelada (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 gelada. 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. Os leucócitos foram contados nos quatro quadrantes encontrados na câmara e tirada a média simples (MATOS *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2018).

Para a contagem diferencial de células no LBA 40 µL das amostras foram centrifugadas em uma Cito-centrífuga (INBRAS equipamentos para saúde, SP, BR) na qual foram colocadas lâminas, e ajustada a rotação em 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 (DE SOUZA *et al.*, 2018).

## 5.9 Processamento do tecido pulmonar e homogeneização

Após a coleta do LBA, foi realizada uma pequena incisão no ventrículo esquerdo e com uma agulha o ventrículo direito foi perfundido com soro fisiológico para remover o sangue residual do pulmão. O pulmão direito foi clampeado para que fosse instilada, apenas no pulmão esquerdo, via traqueia, formalina tamponada 4% (pH 7,2) a uma pressão de 25 cmH<sub>2</sub>O por 2 min. O pulmão esquerdo então foi removido e imerso em solução fixadora por 48 horas. Em seguida, as amostras foram colocadas em cassetes histológicos e processadas da seguinte forma: banho em álcool 70% e 90% por 30 minutos em cada, seguido de dois banhos de álcool absoluto por 30 minutos, dois banhos de xilol por 30 minutos, dois banhos de parafina por 30 minutos e inclusão em parafina histológica. Após o processamento histológico e a inclusão em parafina foram feitos cortes seriados com 4 micrômetros de espessura. Posteriormente, esse material foi corado com hematoxilina e eosina (HE) para ser realizada a análise estereológicas (PENA *et al.*, 2016).

O pulmão direito foi removido e retiradas quatro alíquotas para as análises bioquímicas, o restante do tecido pulmonar foi armazenado em tubos devidamente etiquetados para serem acomodados no freezer (-80°C). Depois, as alíquotas foram homogeneizadas (Homogeneizador Nova Técnica mod. NT136, Piracicaba, Brasil) em 1 mL de tampão fosfato de potássio e centrifugado a 13000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e as amostras foram novamente armazenadas no freezer (-80°C) para posteriores análises bioquímicas (DE SOUZA *et al.*, 2018).

## 5.10 Biomarcadores de estresse oxidativo e dano

### 5.10.1 Proteínas totais

A dosagem de proteínas foi realizada nas amostras do homogeneizado tecidual pelo método de Bradford (1976). O reagente de Bradford contém como principal componente o corante Coomassie brilhante azul, que em solução ácida se liga as proteínas da amostra, alterando sua absorvância de 465 nm para 595 nm. Para essa análise uma curva padrão foi reproduzida por meio de concentrações crescentes da proteína albumina, para isso, 0,01g de albumina foi dissolvida em 1000 µL de água

Mili-Q. A partir dessa solução inicial, foi utilizado 200  $\mu\text{L}$  adicionado em 3,8 mL de água Mili-Q, obtendo-se um total de 4 mL de solução na concentração de 0,5 mg/mL (BRADFORD, 1976). Os pontos da curva variam de 0,5 mg/mL até 0,05 mg/mL, conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1.** Curva padrão albumina.

| Diluição de albumina | Albumina 0,01 g/mL | Água Mili-Q       |
|----------------------|--------------------|-------------------|
| <b>0,5 mg/mL</b>     | 1000 $\mu\text{L}$ | --                |
| <b>0,4 mg/mL</b>     | 800 $\mu\text{L}$  | 200 $\mu\text{L}$ |
| <b>0,3 mg/mL</b>     | 600 $\mu\text{L}$  | 400 $\mu\text{L}$ |
| <b>0,2 mg/mL</b>     | 400 $\mu\text{L}$  | 600 $\mu\text{L}$ |
| <b>0,1 mg/mL</b>     | 200 $\mu\text{L}$  | 800 $\mu\text{L}$ |
| <b>0,05 mg/mL</b>    | 100 $\mu\text{L}$  | 900 $\mu\text{L}$ |

Para a solução de Comassie azul foi realizada a diluição em água Mili-Q na concentração de 4:1 (água Mili-Q: Solução Comassie azul). Feito a curva padrão e a diluição da curva, em seguida foram adicionados em cada poço correspondente 2  $\mu\text{L}$  de amostra do homogenato pulmonar diluído em 8  $\mu\text{L}$  de água Mili-Q. Posteriormente, 190  $\mu\text{L}$  de Solução Comassie azul diluída foi pipetada em todos os poços da placa. A placa então foi incubada em temperatura ambiente por 30 min e a leitura realizada em espectrofotômetro de placas a 595 nm (CAMPOS *et al.*, 2019).

#### 5.10.2 Atividade da Superóxido dismutase (SOD)

Atividade da SOD foi mensurada nos tecidos de acordo com o método descrito por Marklund (1974). Esse método é baseado na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. Os reagentes de trabalho utilizados foram: fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Pirogalol, MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]- 2,5-difenilterazolio) e Dimetilsulfóxido (DMSO). Para a realização da dosagem, foi utilizada uma alíquota do sobrenadante obtido em 5.9. O sobrenadante foi pipetado em placa de 96 poços seguido a adição dos reagentes como descrito na Tabela 2 (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

**Tabela 2.** Reagentes utilizados para mensurar a atividade da Superóxido Dismutase.

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

As amostras foram incubadas por 5 minutos em estufa a 37°C. Logo após, 150 µL de DMSO foram adicionados às mesmas para parar a reação. As absorvâncias foram lidas no leitor de Elisa em um comprimento de onda de 570 nm. Considerando que uma unidade de SOD (U) é responsável pela oxidação de 50% do pirogalol, e que a absorvância da amostra obtida em unidades de SOD, é convertida a absorvância da amostra obtida em unidades de SOD. Para cálculo da atividade de SOD, foi subtraído o resultado obtido da amostra pelo valor encontrado do branco e, a seguir, foi dividido esse valor pelo encontrado da subtração do padrão pelo branco (CAMPOS *et al.*, 2019).

### 5.10.3 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade de Catalase (CAT) foi mensurada de acordo com o método descrito por Aebi (1984), a partir do decréscimo do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a uma absorvância de 240 nm. O método se baseia na decomposição enzimática do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em um intervalo de 60 segundos por espectrofotometria. Para a realização da análise foi utilizada uma alíquota do sobrenadante obtido em 5.9 como amostra biológica. Inicialmente foram utilizados os seguintes reagentes para o preparo do tampão fosfato: cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), os sais foram diluídos em água destilada e mantidos na geladeira. No momento do ensaio foi utilizado 25 mL de tampão, que foram misturados com 40 µL de peróxido de hidrogênio. Depois do preparo dos reagentes foi iniciada a leitura em espectrofotômetro. O tampão com o peróxido foi aliqotado juntamente com cada amostra em cubeta de quartzo (970 µL e 30 µL, respectivamente) e registrados a 240 nm durante 60 segundos, com anotação a cada 10 segundos. A atividade da catalase foi definida pela diminuição da absorvância a

240 nm, de acordo com a Lei de Lambert Beer, onde 1 U equivale a 1  $\mu\text{mol}$  de hidrólise de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto, por mL (PENA *et al.*, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2018).

#### 5.10.4 Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Análise de peroxidação lipídica foi realizada de acordo com método descrito por Buege (1978). O ácido tiobarbitúrico (TBA) reage com lipídios oxidados, e gera malondialdeído. Para a realização da análise foram utilizados 500  $\mu\text{L}$  do homogenato tecidual (obtido em 5.9). Posteriormente, 250  $\mu\text{L}$  de solução de ácido tricloroacético (TCA 28% p/v dissolvido em ácido clorídrico), 250  $\mu\text{L}$  de TBA 1% dissolvido em ácido acético e 125  $\mu\text{L}$  de butilhidroxitolueno (BHT) 5 mM dissolvido em etanol foram adicionados. Em seguida, o tubo foi levado ao vórtex e colocado em banho-maria a 95°C por 15 minutos. Após serem resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, o material foi centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 535 nm. A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ), seguindo a lei de *Lambert Beer*. O resultado foi representado em nmols/mL (CAMPOS *et al.*, 2019).

#### 5.10.5 Proteína Carbonilada

A oxidação de proteínas pelas espécies reativas de oxigênio leva a formação de derivados carbonílicos. Esses podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH reage com grupos carbonílicos e gera a hidrazona correspondente, a qual foi analisada espectrofotometricamente. Para a análise da proteína carbonilada foi utilizado um protocolo adaptado do método descrito por Reznick e Packer (1994). Para tal foram utilizados 500  $\mu\text{L}$  do homogeneizado pulmonar que foi colocado em tubos de polipropileno e adicionados 500  $\mu\text{L}$  de TCA, misturou-se no vórtex e em seguida as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e no escuro, por sessenta minutos e a cada 15 minutos eram misturadas no vórtex. Ao final do período foi

acrescentado 500  $\mu\text{L}$  de TCA e as amostras eram novamente centrifugadas por 3 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 1 mL da mistura de etanol/acetato de etila (1:1) foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex e novamente centrifugados, essa etapa da reação foi repetida por duas vezes. Após a segunda lavagem com a solução de etanol/acetato de etila o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de Dodecil sulfato de sódio (SDS) 6% misturou-se no vórtex e centrifugou-se à 10000 rpm por 3 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro a 370 nm (ANDRADE *et al.*, 2018). A concentração de proteína carbonilada nas amostras foi determinada de acordo com a equação de *Lambert Beer* descrita abaixo:

- Abs = Absorbância
- $\epsilon$  = coeficiente de extinção molar em unidades de  $22000 \text{ M.L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;
- 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).

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

### 5.11 Mieloperoxidase (MPO)

Para realizar a dosagem dos níveis da MPO foi utilizado o homogenato pulmonar dos animais estudados. Os níveis de MPO foram medidos por meio do uso de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e tampão de acetato de sódio (NaOAc). Primeiramente, 100  $\mu\text{L}$  de homogeneizado de tecido pulmonar foram centrifugados com 900  $\mu\text{L}$  de HTAB por 14000 g durante 15 minutos, 75  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi incubado com 5  $\mu\text{L}$  de TMB por 5 min em 37°C. O produto desta preparação foi incubado com 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 10 min a 37°C, em seguida, foi adicionado 125  $\mu\text{L}$  de tampão de acetato de

sódio. A reação foi lida num leitor de microplaca em 630 nm. A atividade enzimática foi expressa em Um/mg proteína total (CAMPOS *et al.*, 2019).

### 5.12 Ensaio imunoenzimático para marcadores inflamatórios

As análises de interleucina - 1 (IL-1), interleucina - 6 (IL-6), CCL5 (do inglês *Regulated upon activation normal T-cell expressed, and secreted*), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), foram realizadas no tecido homogeneizado do pulmão misturado com 1 mL de tampão fosfato. Para as análises teciduais do pulmão foram necessários 100 mg de tecido foi homogeneizado com 1 mL de tampão fosfato. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, o sobrenadante foi congelado a -80 °C e, posteriormente, utilizadas para análises por meio do método Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Esses ensaios foram realizados utilizando kits, sendo todos os anticorpos e reagentes reconstituídos e aliquotados de acordo com as orientações dos fabricantes e as análises foram realizadas como descrito a seguir.

Em resumo, em placas de 96 poços foram adicionados 100  $\mu$ L 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 Tween 20) e as placas foram bloqueadas com 100  $\mu$ L/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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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 adquirida pelo mesmo fabricante (Color reagent A - R&D Systems, Minneapolis, USA). 100  $\mu$ L 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para o bloqueio das reações. A quantificação da quimiocina 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 (BEZERRA *et al.*, 2019; FROES *et al.*, 2019).

### 5.13 Análises estereológicas do tecido pulmonar

Para a realização da estereologia, as lâminas coradas em HE foram fotografadas utilizando o microscópio de luz Primo Star (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha), que 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<sub>v</sub> [sa]) e dos espaços alveolares (V<sub>v</sub> [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 (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003; DE SOUZA *et al.*, 2018).

### 5.14 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism versão 5.0 (San Diego, CA, EUA). A distribuição paramétrica dos dados foi avaliada utilizando o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram expressos em média e erro padrão da média, os dados não paramétricos foram expressos em mediana, valor máximo e valor mínimo. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste de variância (One-way ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey, para dados não paramétricos foi aplicado o teste de

Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns. As diferenças significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Parâmetros hemodinâmicos

Durante todo o período de ventilação espontânea ou mecânica, os parâmetros cardiovasculares, tais como a frequência cardíaca e pressão arterial média foram monitorados e podem ser observados na Tabela 3. Na frequência cardíaca não observamos diferença significativa entre os grupos estudados, porém, em relação a PAM, observamos que foi maior no grupo VM12 quando comparado ao grupo VM4.

**Tabela 3.** Parâmetros hemodinâmicos.

| Grupo      | GC           | VM4          | VM8          | VM12                      |
|------------|--------------|--------------|--------------|---------------------------|
| FC (bpm)   | 406 ± 10,69  | 406 ± 5,47   | 415 ± 7,31   | 417 ± 6,04                |
| PAM (mmHg) | 115,7 ± 2,56 | 113,5 ± 2,60 | 119,4 ± 2,11 | 134,1 ± 2,52 <sup>b</sup> |

GC – Grupo controle; VM4 – Grupo ventilação mecânica 4 mL/kg; VM8 – Grupo ventilação mecânica 8 mL/kg e VM12 - Grupo ventilação mecânica 12 mL/kg. FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média. (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo VM4. Os dados paramétricos estão expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ),  $n=8$ .

### 6.2 Função pulmonar

Na tabela 4, podemos observar os dados referentes a função pulmonar. Não houve diferença significativa na frequência respiratória no grupo controle quando comparado aos demais grupos. Em relação ao volume corrente (VC) e volume minuto ( $V_{min}$ ), como proposto pelo desenho experimental deste estudo, foi observado um aumento dos valores no grupo VM12 quando comparado aos grupos GC, VM4 e VM8.

**Tabela 4.** Função pulmonar.

| Grupo                        | GC             | VM4                       | VM8                        | VM12                             |
|------------------------------|----------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| FR<br>(irpm)                 | 88,00 ± 7,60   | 70,50 ± 0,59              | 70,50 ± 0,50               | 70,38 ± 0,46                     |
| VC<br>(mL)                   | 2,28 ± 0,29    | 1,37 ± 0,04 <sup>a</sup>  | 2,76 ± 0,06 <sup>b</sup>   | 4,15 ± 0,10 <sup>a, b, c</sup>   |
| V <sub>min</sub><br>(mL/min) | 182,90 ± 28,19 | 96,77 ± 2,03 <sup>a</sup> | 194,80 ± 3,13 <sup>b</sup> | 292,10 ± 5,64 <sup>a, b, c</sup> |

GC – Grupo controle; VM4 – Grupo ventilação mecânica 4 mL/kg; VM8 – Grupo ventilação mecânica 8 mL/kg e VM12 - Grupo ventilação mecânica 12 mL/kg. FR: frequência respiratória; VC: volume corrente; V<sub>min</sub>: volume minuto. (a) representa diferença significativa quando comparado ao GC; (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo VM4 e (c) representa diferença significativa quando comparado ao grupo VM8. Os dados paramétricos estão expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey (p <0,05), n=8.

### 6.3 Análises gasométricas

Para avaliar a condição fisiológica dos animais estudados, analisamos os gases distribuídos no sangue por meio da gasometria arterial, os resultados podem ser observados na Tabela 5. Observamos uma elevação no valor do pH do grupo VM12 quando comparado aos grupos GC, VM4 e VM8, em relação ao PCO<sub>2</sub> e HCO<sub>3</sub> o grupo VM12 apresentou valores menores quando comparado ao grupo GC, VM4 e VM8. No que se refere a oxigenação, observou-se que a PO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e a relação PO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> foram maiores no grupo VM12 quando comparado ao VM4.

**Tabela 5.** Análises gasométricas.

| <b>Grupo</b>                                     | <b>GC</b>      | <b>VM4</b>                  | <b>VM8</b>                 | <b>VM12</b>                     |
|--|----------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| <b>pH</b>  | 7,39 ± 0,01    | 7,24 ± 0,01 <sup>a</sup>    | 7,41 ± 0,01 <sup>b</sup>   | 7,50 ± 0,01 <sup>a, b, c</sup>  |
| <b>PO<sub>2</sub><br/>(mmHg)</b>                 | 72,73 ± 6,74   | 50,98 ± 2,45 <sup>a</sup>   | 70,23 ± 3,32 <sup>b</sup>  | 74,23 ± 2,29 <sup>b</sup>       |
| <b>PCO<sub>2</sub><br/>(mmHg)</b>                | 35,98 ± 1,69   | 64,16 ± 1,67 <sup>a</sup>   | 31,56 ± 2,06 <sup>b</sup>  | 17,27 ± 1,26 <sup>a, b, c</sup> |
| <b>HCO<sub>3</sub><br/>(mEq/L)</b>               | 22,77 ± 1,06   | 28,08 ± 0,85 <sup>a</sup>   | 20,43 ± 0,52 <sup>b</sup>  | 13,08 ± 0,29 <sup>a, b, c</sup> |
| <b>SO<sub>2</sub> (%)</b>                        | 91,27 ± 2,36   | 76,80 ± 2,88                | 94,31 ± 0,92 <sup>b</sup>  | 96,83 ± 0,53 <sup>b</sup>       |
| <b>PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub><br/>(mmHg)</b> | 371,80 ± 36,23 | 243,70 ± 11,73 <sup>a</sup> | 336,0 ± 15,91 <sup>b</sup> | 379,90 ± 26,41 <sup>b</sup>     |

GC – Grupo controle; VM4 – Grupo ventilação mecânica 4 mL/kg; VM8 – Grupo ventilação mecânica 8 mL/kg e VM12 - Grupo ventilação mecânica 12 mL/kg. pH: potencial hidrogeniônico; PO<sub>2</sub>: pressão parcial de oxigênio; PCO<sub>2</sub>: pressão parcial de gás carbônico; HCO<sub>3</sub>: bicarbonato; SO<sub>2</sub>: saturação de oxigênio; PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>: relação entre pressão parcial de oxigênio com fração inspirada de oxigênio. (a) representa diferença significativa quando comparado ao GC; (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo VM4 e (c) representa diferença significativa quando comparado ao grupo VM8. Os dados paramétricos estão expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey (p <0,05), n=8.

#### 6.4 Parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos dos grupos experimentais foram obtidos e quantificados através dos valores de hemoglobina, eritrócito e hematócrito. Conforme representado na Tabela 6, a ventilação mecânica com alto volume corrente aumentou o número de hemoglobina e hematócrito no grupo VM12 quando comparados ao GC e VM4.

**Tabela 6.** Parâmetros hematológicos.

| <b>Grupo</b>  | <b>GC</b>    | <b>VM4</b>   | <b>VM8</b>   | <b>VM12</b>                  |
|---|--------------|--------------|--------------|------------------------------|
| <b>Hemoglobina (g/dL)</b>                           | 16,06 ± 0,42 | 16,30 ± 0,35 | 16,66 ± 0,29 | 17,71 ± 0,28 <sup>a, b</sup> |
| <b>Eritrócito (x 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 7,68 ± 0,11  | 7,55 ± 0,20  | 7,59 ± 0,07  | 8,03 ± 0,13                  |
| <b>Hematócrito (%)</b>                              | 48,17 ± 1,26 | 48,90 ± 1,06 | 49,97 ± 0,87 | 53,14 ± 0,84 <sup>a, b</sup> |

GC – Grupo controle; VM4 – Grupo ventilação mecânica 4 mL/kg; VM8 - ventilação mecânica 8 mL/kg e VM12 - ventilação mecânica 12 mL/kg. (a) representa diferença significativa quando comparado ao GC e (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo VM4. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ),  $n=8$ .

### 6.5 Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA

A presença de células inflamatórias nas vias aéreas nos grupos experimentais foi avaliada por meio da contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar. Conforme pode ser visto na Tabela 7, em relação aos leucócitos totais não houve diferença estatística nos diferentes grupos estudados. No entanto, na contagem diferencial foi observado um aumento no influxo de neutrófilos no LBA no VM12 quando comparado ao GC, para as demais células inflamatórias (macrófagos e linfócitos) não foi observada diferença significativa entre os grupos.

**Tabela 7.** Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA.

| <b>Grupo</b>                                 | <b>GC</b>    | <b>VM4</b>   | <b>VM8</b>   | <b>VM12</b>              |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------------------|
| <b>Leucócitos<br/>(x 10<sup>5</sup>/mL)</b>  | 12,79 ± 1,54 | 10,84 ± 0,98 | 11,78 ± 0,50 | 12,54 ± 1,16             |
| <b>Macrófagos<br/>(x 10<sup>5</sup>/mL)</b>  | 12,26 ± 1,56 | 9,84 ± 1,02  | 10,91 ± 0,52 | 10,55 ± 1,07             |
| <b>Neutrófilos<br/>(x 10<sup>5</sup>/mL)</b> | 0,41 ± 0,28  | 0,82 ± 0,14  | 0,73 ± 0,13  | 1,62 ± 0,24 <sup>a</sup> |
| <b>Linfócitos<br/>(x 10<sup>5</sup>/mL)</b>  | 0,17 ± 0,07  | 0,18 ± 0,03  | 0,13 ± 0,03  | 0,46 ± 0,15              |

GC – Grupo controle; VM4 – Grupo ventilação mecânica 4 mL/kg; VM8 – Grupo ventilação mecânica 8 mL/kg e VM12 - Grupo ventilação mecânica 12 mL/kg. (a) representa diferença significativa quando comparado ao GC. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ),  $n=8$ .

### 6.7 Análise de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar

Os marcadores inflamatórios CCL5, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  foram analisados no tecido pulmonar, conforme descrito na Tabela 8. A ventilação mecânica com alto volume corrente (12 mL/kg) resultou em uma diminuição da CCL5 quando comparado ao GC, entretanto foi observado um aumento nos níveis de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  no grupo VM12 quando comparado ao GC e VM4.

**Tabela 8.** Análise das citocinas inflamatórias no tecido pulmonar.

| Grupo                                      | GC             | VM4            | VM8            | VM12                            |
|--|----------------|----------------|----------------|---------------------------------|
| <b>CCL5<br/>(pg/mL)</b>                    | 526,9 ± 50,40  | 336,4 ± 54,96  | 328,3 ± 65,92  | 241,2 ± 22,29 <sup>a</sup>      |
| <b>IL-1<br/>(pg/mL)</b>                    | 468,9 ± 58,55  | 614,2 ± 61,94  | 776,80 ± 27,52 | 943,00 ± 112,80 <sup>a, b</sup> |
| <b>IL-6<br/>(pg/mL)</b>                    | 1553,0 ± 60,70 | 1505,0 ± 58,19 | 1739,0 ± 24,49 | 1809,0 ± 53,76 <sup>a, b</sup>  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math><br/>(pg/mL)</b> | 1293,0 ± 83,66 | 1263,0 ± 38,35 | 1420,0 ± 53,29 | 1572,0 ± 50,71 <sup>a, b</sup>  |

GC – Grupo controle; VM4 – Grupo ventilação mecânica 4 mL/kg; VM8 – Grupo ventilação mecânica 8 mL/kg e VM12 - Grupo ventilação mecânica 12 mL/kg. (a) representa diferença significativa quando comparado ao GC; (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo VM4 e (c) representa diferença significativa quando comparado ao grupo VM8. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ),  $n=8$ .

## 6.6 Análises bioquímicas do dano e o estresse oxidativo

Em relação ao dano da membrana lipídica, houve aumento da concentração de TBARS no VM12 quando comparado ao GC, VM4 e VM8, e a avaliação da oxidação de proteínas revelou maiores valores em VM12 quando comparado ao CG e VM4, conforme expresso na Tabela 9. A atividade da MPO se mostrou elevada no VM12 quando comparado ao GC. Em relação às enzimas antioxidantes, observamos que a atividade da SOD aumentou no VM12 quando comparado ao GC e VM4, em relação a atividade da CAT, observamos um aumento da atividade no VM12 quando comparado ao GC.

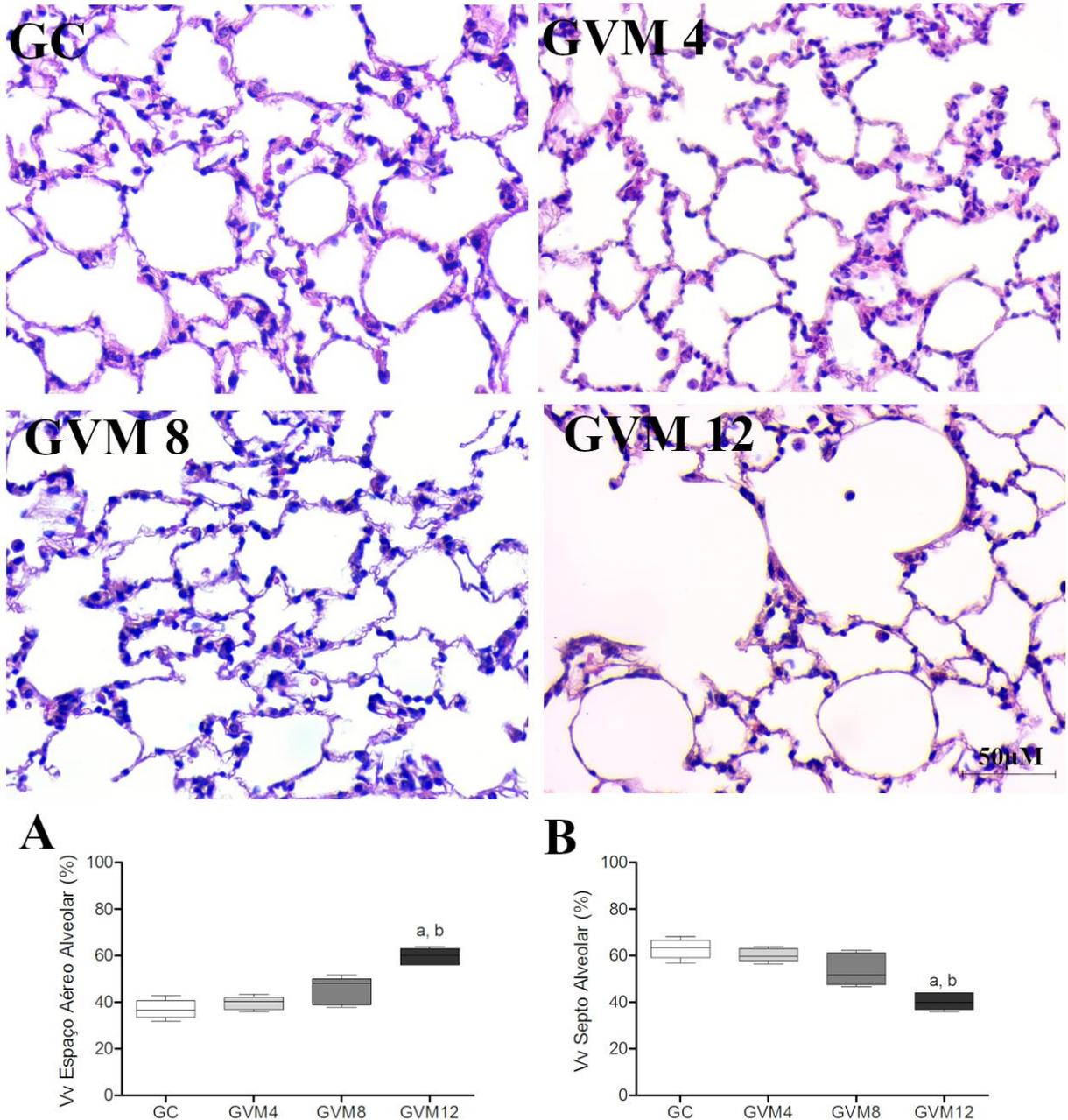
**Tabela 9.** Análise do estresse oxidativo no tecido pulmonar.

| <b>Grupo</b>                      | <b>GC</b>    | <b>VM4</b>   | <b>VM8</b>   | <b>VM12</b>                    |
|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------------------------|
| <b>TBARS<br/>(nmol/mg ptn)</b>    | 0,80 ± 0,09  | 0,71 ± 0,18  | 0,71 ± 0,05  | 1,74 ± 0,25 <sup>a, b, c</sup> |
| <b>PTN Carb<br/>(nmol/mg ptn)</b> | 6,41 ± 0,77  | 6,88 ± 0,83  | 7,14 ± 0,70  | 17,69 ± 1,40 <sup>a, b</sup>   |
| <b>MPO<br/>(U/mg ptn)</b>         | 0,35 ± 0,05  | 0,60 ± 0,09  | 0,50 ± 0,05  | 1,35 ± 0,25 <sup>a</sup>       |
| <b>SOD<br/>(U/mg ptn)</b>         | 18,59 ± 1,00 | 18,01 ± 2,50 | 25,32 ± 3,26 | 33,96 ± 5,50 <sup>a, b</sup>   |
| <b>CAT<br/>(U/mg ptn)</b>         | 3,09 ± 0,43  | 3,48 ± 0,49  | 3,87 ± 0,22  | 5,39 ± 0,76 <sup>a</sup>       |

GC – Grupo controle; VM4 – Grupo ventilação mecânica 4 mL/kg; VM8 – Grupo ventilação mecânica 8 mL/kg e VM12 - Grupo ventilação mecânica 12 mL/kg. TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PTN Carb: proteína carbonilada; MPO: mieloperoxidase; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase. (a) representa diferença significativa quando comparado ao GC; (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo VM4 e (c) representa diferença significativa quando comparado ao grupo VM8. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ),  $n=8$ .

## 6.8 Análises estereológicas

As análises estereológicas mostraram que a ventilação mecânica com alto volume corrente promoveu dano ao parênquima pulmonar. Conforme apresentado na Figura 10, os animais que foram ventilados a 12 mL/kg (VM12) apresentaram um aumento na densidade do espaço aéreo alveolar e, conseqüentemente, uma redução na densidade de septos alveolares, quando comparado ao GC e VM4.



**Figura 11.** Análises estereológicas. (GC) Corte histológico do parênquima pulmonar do GC corado com HE; (GVM4) Corte histológico do parênquima pulmonar do VM4 corado com HE; (GVM8) Corte histológico do parênquima pulmonar do VM8 corado com HE; (GVM12) Corte histológico do parênquima pulmonar do VM12 corado com HE; (A) Densidade volumétrica do espaço aéreo alveolar e (B) Densidade volumétrica dos septos alveolares. (a) representa diferença significativa quando comparado ao GC e (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo VM4. Os dados estão expressos como mediana, valor mínimo e valor máximo e foram analisados pelo teste de variância Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunns ( $p < 0,05$ ),  $n=8$ .

## 7. DISCUSSÃO

Neste estudo experimental, avaliamos os efeitos da ventilação mecânica com diferentes volumes correntes em ratos saudáveis ventilados artificialmente. A ventilação mecânica é um tratamento necessário para insuficiência respiratória sendo uma medida de suporte em pacientes críticos, entretanto, é bem conhecido que a VM possa ser prejudicial e causar danos aos pulmões. Em geral, a mortalidade é alta nos pacientes em que é instituída a VM, por isso, rotineiramente os pacientes submetidos a esse tratamento precisam ser monitorizados hemodinamicamente (LAMIA; MOLANO; MUIR; CUVELIER, 2016; SCHMIDT; AMARAL; FAN; RUBENFELD, 2018). Em nosso estudo, observamos que a frequência cardíaca (FC) não apresentou alteração entre os diferentes volumes correntes analisados (4, 8 e 12 mL/kg) durante 1 h de VM sem o uso de PEEP. Nossos dados corroboram com estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, em que ratos Wistar saudáveis submetidos a VM com volume corrente de 7 mL/kg sem o uso da PEEP, não houve alterações na frequência cardíaca quando comparado aos animais controles sob ventilação espontânea (ANDRADE *et al.*, 2018). Em relação a PAM, observamos que o grupo VM12 não apresentou diferença estatística quando comparado ao GC, entretanto, foi observado um maior valor na PAM no grupo ventilado com o alto volume corrente quando comparado ao grupo VM4. De Barros e colaboradores, relataram que a utilização de PEEP durante a ventilação mecânica pode proporcionar alteração na função hemodinâmica, segundo estes autores, com o aumento da pressão intratorácica há uma diminuição do débito cardíaco, e conseqüentemente uma significativa redução da pressão arterial média (DE BARROS; DE BARROS; SANGEAN; VEGA, 2007). Em contrapartida, Moreira e colaboradores, utilizando ratos *Sprague-Dawley* machos ventilados artificialmente demonstraram que pode haver um envolvimento de vias centrais no controle cardiovascular por meio da estimulação de quimiorreceptores excitados pelos níveis de CO<sub>2</sub> cerebral favorecendo um aumento da PAM (MOREIRA; TAKAKURA *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2011).

A proposta deste estudo foi de utilizar volumes correntes de 4, 8 e 12 mL/kg, dessa maneira, como não foi adequada a frequência respiratória era esperado que o volume minuto aumentasse proporcionalmente de acordo com cada grupo experimental, uma vez que, o volume minuto é o produto da frequência respiratória e

volume corrente ( $FR \times VC$ ) (CARVALHO; JUNIOR; FRANCA, 2007). Os achados de Caruso e colaboradores corroboram com nosso estudo, em seu protocolo experimental utilizaram ratos ventilados com 6 e 25 mL/kg, sem o ajuste da frequência respiratória, mantendo no grupo alto volume corrente um maior volume minuto (CARUSO *et al.*, 2003).

Nosso estudo também trouxe como proposta monitorar e comparar os parâmetros de troca gasosa entre os grupos ventilados. Especificamente nossos achados mostraram que o grupo ventilado com alto volume corrente mesmo apresentando danos importantes no parênquima pulmonar, em geral não apresentou alterações importantes em relação a oxigenação quando comparado com os outros grupos. Nossos achados corroboram com os de Andrews e colaboradores que demonstraram que ratos ventilados com diferentes níveis de PEEP desenvolvem dano pulmonar, entretanto, mantiveram boa oxigenação, sugerindo que a utilização deste parâmetro de forma isolada (oxigenação) pode não ser um bom marcador para relatar danos no parênquima pulmonar de animais (ANDREWS *et al.*, 2015), Maruscak e colaboradores também utilizando ratos ventilados com diferentes volumes e PEEP, observaram que a oxigenação não sofreu alterações entre seus grupos até os 90 minutos de ventilação (MARUSCAK *et al.*, 2008). Em nosso experimento, o grupo ventilado com baixo volume corrente apresentou menores valores na oxigenação, esse resultado já era esperado uma vez que, na literatura 4 mL/kg tem sido demonstrado insuficiente para proporcionar um volume minuto que garanta as trocas gasosas ideais (BARBAS *et al.*, 2007).

Outro achado importante em relação às análises gasométricas é a alteração do pH e  $PCO_2$  sanguíneo, em nosso estudo o grupo ventilado com alto volume corrente apresentou um pH maior e a  $PCO_2$  menor quando comparado ao grupo de baixo volume corrente. Como descrito por Hopper e colaboradores, a  $PCO_2$  é proporcional à produção de dióxido de carbono e inversamente proporcional à ventilação minuto alveolar (HOPPER, 2017). Moraes e colaboradores ventilaram ratos com altos volumes correntes por duas horas, encontraram um pH menor no grupo ventilado com 22 mL/kg quando comparado ao grupo 6 mL/kg e uma maior concentração de  $CO_2$  sanguíneo (MORAES *et al.*, 2018). Podemos justificar essa divergência de resultados ao fato de Moraes e colaboradores utilizaram como alto volume corrente um valor supra fisiológico que resultou em grande destruição do parênquima pulmonar,

enquanto a diretriz de ventilação mecânica recomenda a utilização de 5 a 8 mL/kg (BARBAS *et al.*, 2014).

Em relação às concentrações de hemoglobina e percentual de hematócrito observamos um aumento no grupo ventilado com alto volume corrente. A hemoglobina tem como principal função o transporte de oxigênio, já o hematócrito representa o percentual de hemácias do sangue. Estudos demonstraram que a estimulação hipóxica tecidual pode resultar na ativação de uma resposta fisiológica por meio da produção de fator induzível por hipóxia (HIF1), que é o principal fator responsável pela ativação transcricional do gene da eritropoietina, resultando na produção de células sanguíneas e no aumento da entrega de oxigênio aos tecidos (PRCHAL, 2005; SOCOLOVSKY, 2007). Glass e colaboradores descreveram que alguns fatores podem afetar a posição da curva de dissociação hemoglobina. Dentre estes fatores o pH sanguíneo, segundo estes autores, quando ocorre uma alcalose sanguínea a curva desloca-se para a esquerda, a saturação da hemoglobina para uma determinada  $PO_2$  aumenta devido a um aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (GLASS, 2019). Em nosso modelo usamos a ventilação com 12 mL/kg de volume corrente para promover uma lesão ao tecido pulmonar induzida pelo ventilador mecânico, apesar de ventilarmos os animais por apenas 60 minutos observamos uma alcalose e um importante dano ao parênquima pulmonar, entretanto, a oxigenação manteve-se com valores próximos ao grupo ventilado com 8 mL/kg, dessa maneira, sugerimos que a oxigenação permaneceu inalterada, sugerimos que por causa do valor aumentado da hemoglobina e do hematócrito.

Em relação à inflamação pulmonar, nossos resultados mostraram um maior valor do número de neutrófilos no lavado broncoalveolar do grupo ventilado com alto volume corrente quando comparado ao grupo sob ventilação espontânea. Os neutrófilos são as primeiras células de defesa do sistema imunológico que são recrutadas para o foco inflamatório (PERL *et al.*, 2007). Possivelmente, as alterações da barreira alvéolo capilar e os danos no endotélio podem gerar alteração da permeabilidade vascular e favorecer a ativação de macrófagos que liberam mediadores inflamatórios locais favorecendo ao influxo dos neutrófilos para os pulmões (WOODS *et al.*, 2015; CURLEY; LAFFEY; ZHANG; SLUTSKY, 2016). Nossos resultados corroboram com os dados do estudo de Cagle e colaboradores que relataram maior porcentagem de neutrófilos no lavado broncoalveolar de

camundongos ventilados por duas horas com volume corrente de 15 mL/kg quando comparado ao grupo 8 mL/kg (CAGLE *et al.*, 2017).

Nesse estudo, foi realizado um ensaio imunoenzimático a fim de analisar o envolvimento da quimiocina CCL5 e das interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e TNF- $\alpha$  no processo inflamatório pulmonar. A CCL5 desempenha um papel importante no recrutamento de neutrófilos em modelos de lesão pulmonar aguda (PAN; PARKYN; RAY; RAY, 2000). Recentemente, Bezerra e colaboradores utilizando camundongos em um modelo de exposição a hiperóxia (100% de O<sub>2</sub>) durante 24 horas, observaram menores concentrações de CCL5 no homogenato pulmonar nos animais expostos quando comparado aos expostos ao ar ambiente (BEZERRA *et al.*, 2019). Huang e colaboradores observaram menores valores dos níveis de CCL5 no sangue de pacientes com síndrome respiratória aguda grave submetidos a ventilação mecânica, descrevem esses achados como um downregulation na fase aguda, segundo eles esse achado refere-se a uma tentativa do organismo de minimizar o processo inflamatório. No presente estudo também observamos a redução nos níveis da quimiocina CCL5 no homogenato pulmonar nos animais submetidos a 1 hora de VM com volume corrente de 12mL/kg quando comparado aos animais controle ou sob VM com menores volumes correntes (HUANG *et al.*, 2005).

Em relação as interleucinas, demonstramos um aumento dos níveis de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  no grupo submetido a VM com alto volume corrente, nossos dados corroboram com Tremblay e colaboradores que relataram aumento nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 no lavado pulmonar de ratos *Sprague Dawley* ventilados por 2 horas com grandes volumes correntes (40 mL/kg) sem PEEP (TREMBLAY; VALENZA; RIBEIRO; LI *et al.*, 1997). O aumento da IL-1 também foi relatado por Timmermans e colaboradores, pelo quais mostraram que essa interleucina desempenha um papel importante na iniciação e propagação da resposta inflamatória induzida pela ventilação mecânica em camundongos ventilados por 4 horas com volume corrente de 8 mL/kg (TIMMERMANS *et al.*, 2013). Já Cannizzaro e colaboradores demonstraram maiores níveis de IL-6 no LBA de ratos submetidos a ventilação mecânica por 4 horas com 7 e 21 mL/kg quando comparados ao grupo ventilação espontânea, entretanto, não houve diferença para TNF- $\alpha$  (CANNIZZARO *et al.*, 2010).

As citocinas são produzidas por vários tipos de células, sendo responsáveis por iniciar e promover respostas fisiológicas sob diferentes estímulos, podendo resultar em ativação excessiva da cascata inflamatória e na superprodução de mediadores

pró-inflamatórios. Em 1999, Ranieri e colaboradores demonstraram aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 no lavado broncoalveolar de pacientes com síndrome da angustia respiratória aguda (RANIERI *et al.*, 1999). Em geral, nosso estudo corrobora com estudos anteriores, uma vez que demonstramos que a ventilação mecânica com alto volume corrente induziu ativação de células inflamatórias e, conseqüentemente, levou a produção e liberação dos mediadores TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 observados na análise do homogenato pulmonar (WALLACE *et al.*, 2009; TIMMERMANS *et al.*, 2013; WANG; LIU; XU, 2017).

De outro modo, o recrutamento de células inflamatórias para o parênquima pulmonar pode induzir a lesão pulmonar aguda por meio do aumento de espécies reativas de oxigênio que leva ao estresse oxidativo (SUN *et al.*, 2015). Um modo de analisar o dano pulmonar induzido pela ventilação mecânica é avaliar a peroxidação lipídica e de oxidação de proteínas de amostras obtidas do parênquima pulmonar dos diferentes grupos experimentais (SCHOLPP; SCHUBERT; MIEKISCH; GEIGER, 2002; ANDRADE *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2018). Em nosso estudo, observamos que somente os animais ventilados com alto volume corrente apresentaram maiores valores na peroxidação lipídica e oxidação de proteínas quando comparados aos animais sob ventilação espontânea. Nossos resultados corroboram com estudos de Andrade e colaboradores que ventilaram ratos saudáveis, sem utilizar PEEP, volume corrente de 7 mL/kg e não houve aumento da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas no parênquima pulmonar (ANDRADE *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2018). Entretanto, De Souza e colaboradores, observaram que camundongos submetidos a ventilação mecânica com 7 mL/kg de volume corrente durante 1 hora houve aumento nas concentrações de TBARS e proteína carbonilada no parênquima pulmonar comparado ao grupo não-ventilado (DE SOUZA *et al.*, 2018). Em nosso estudo, a VM com alto volume promoveu o aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) no homogenato pulmonar. Nossos resultados corroboram com os dados obtidos por Li e colaboradores que ventilaram camundongos com 6 ou 30 ml/kg durante 1 e 4 horas e observaram um aumento dos níveis de MPO no homogenato pulmonar do grupo alto volume corrente quando comparado ao grupo baixo volume corrente (LI *et al.*, 2014).

Em resposta aos danos causados ao tecido pulmonar, os organismos apresentam um sistema de defesa antioxidante que objetiva bloquear ou diminuir os danos oxidativos, como por exemplo as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008). Em nosso estudo, os animais

submetidos à ventilação com alto volume corrente apresentaram um aumento das atividades da SOD e CAT. A SOD é uma importante enzima antioxidante que protege as células contra danos causados pelo ânion superóxido, uma vez que catalisa a reação de dismutação de radicais superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, enquanto a catalase é uma das enzimas responsáveis por reduzir o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (BIRBEN *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado o importante papel da infiltração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, no aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequentemente ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes na tentativa de minimizar os danos causados pelas EROs no parênquima pulmonar no modelo experimental de LPIV (REDDY; HASSOUN; BROWER, 2007). Wu e colaboradores demonstraram que a administração intravenosa de SOD e ratos com dano pulmonar causado pela ventilação com alto volume corrente (18 mL/kg) foi capaz de reduzir a lesão pulmonar e o estresse oxidativo (WU *et al.*, 2017). Hahn e colaboradores demonstram que existe uma rápida expressão de enzimas antioxidantes em resposta a agressões oxidantes. Apontam este fato para evidências emergentes que apoiam fortemente um papel central para o Nrf2 (Fator nuclear eritróide 2), sendo importante para regular o *status redox*, conferindo proteção contra os estímulos pró-oxidantes, uma vez que, essa via apresenta como gene alvo o caminho para a produção de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutatona (HAHN; OLIVEIRA; BOCK, 2017).

De modo adicional, as análises estereológicas demonstraram que houve dano ao parênquima pulmonar, especificamente observamos que o grupo ventilado com maior volume corrente apresentou um aumento na densidade de espaço alveolar e redução da densidade de septos alveolares. Nossos resultados corroboram com os dados de Izquierdo-Garcia e colaboradores que mostraram em seu protocolo experimental com ratos que a ventilação com alto volume corrente 25 mL/kg promoveu lesão epitelial, endotelial e também em componentes da matriz extracelular quando comparado ao grupo baixo volume corrente (9 mL/kg) (IZQUIERDO-GARCIA *et al.*, 2014). Moraes e colaboradores também observaram que a ventilação com alto volume corrente foi capaz de aumentar os danos ao epitélio e as células endoteliais no grupo com volume corrente de 22 mL/kg, assim como houve aumento da expressão de

RNA*m* para IL-6, um mediador pró-inflamatório (IZQUIERDO-GARCIA *et al.*, 2014; GAGGAR; WEATHINGTON, 2016; MORAES *et al.*, 2018).

## **8. CONCLUSÕES**

Nossos resultados sugerem que o alto volume corrente promoveu inflamação pulmonar aguda e desequilíbrio redox em ratos saudáveis submetidos à ventilação mecânica durante um curto período de tempo. Todavia, novos estudos experimentais e clínicos associando o tempo de ventilação mecânica, bem como altos volumes correntes serão necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nas lesões pulmonares induzidas pelo ventilador mecânico.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. Neutrophils and acute lung injury. **Crit Care Med**, 31, n. 4 Suppl, p. S195-199, Apr 2003.

AHMED, S.; DANIEL MARTIN, A.; SMITH, B. K. Inspiratory Muscle Training in Patients with Prolonged Mechanical Ventilation: Narrative Review. **Cardiopulm Phys Ther J**, 30, n. 1, p. 44-50, Jan 2019.

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.

ANDREWS, P. L.; SADOWITZ, B.; KOLLISCH-SINGULE, M.; SATALIN, J. *et al.* Alveolar instability (atelectrauma) is not identified by arterial oxygenation predisposing the development of an occult ventilator-induced lung injury. *In: Intensive Care Med Exp*, 2015. v. 3.

BARBAS, C. S.; ISOLA, A. M.; FARIAS, A. M.; CAVALCANTI, A. B. *et al.* Brazilian recommendations of mechanical ventilation 2013. Part I. **Rev Bras Ter Intensiva**, 26, n. 2, p. 89-121, Apr-Jun 2014.

BARBAS, C. S.; PINHEIRO BDO, V.; VIANNA, A.; MAGALDI, R. *et al.* [Mechanical ventilation in acute asthma crisis]. **Rev Bras Ter Intensiva**, 19, n. 2, p. 258-263, Jun 2007.

BARBOSA, K. B. F.; BRESSAN, J. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. Revista de Nutrição, 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732010000400013](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000400013).

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

BELPERIO, J. A.; KEANE, M. P.; BURDICK, M. D.; LONDHE, V. *et al.* Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. **J Clin Invest**, 110, n. 11, p. 1703-1716, Dec 2002.

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.

BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. **Antioxid Redox Signal**, 18, n. 13, p. 1557-1593, May 1 2013.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S. *et al.* Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organ J**, 5, n. 1, p. 9-19, Jan 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.

CAGLE, L. A.; FRANZI, L. M.; LINDERHOLM, A. L.; LAST, J. A. *et al.* Effects of positive end-expiratory pressure and recruitment maneuvers in a ventilator-induced injury mouse model. **PLoS One**, 12, n. 11, p. e0187419, 2017.

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. 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.

CAMPOS, K. K. D.; DE OLIVEIRA RAMOS, C.; MARTINS, T. L.; COSTA, G. P. *et al.* Lycopene mitigates pulmonary emphysema induced by cigarette smoke in a murine model. **J Nutr Biochem**, 65, p. 93-100, Mar 2019.

CANNIZZARO, V.; BERRY, L. J.; NICHOLLS, P. K.; HANTOS, Z. *et al.* High tidal volume ventilation is not deleterious in infant rats exposed to severe hemorrhage. **J Trauma**, 69, n. 4, p. E24-31, Oct 2010.

CARLOS TOUFEN JUNIOR, C. R. R. D. C. **Ventiladores mecânicos**. *Medicine, Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 2007. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132007000800002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132007000800002&script=sci_arttext).

CARUSO, P.; MEIRELES, S. I.; REIS, L. F.; MAUAD, T. *et al.* Low tidal volume ventilation induces proinflammatory and profibrogenic response in lungs of rats. **Intensive Care Med**, 29, n. 10, p. 1808-1811, Oct 2003.

CARVALHO, C. R. R. D.; JUNIOR, C. T.; FRANCA, S. A. **Ventilação mecânica: princípios, análise gráfica e modalidades ventilatórias**. suppl.2, Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2007. ISSN Print version ISSN 1806-3713 On-line version ISSN 1806-3756. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-37132007000800002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132007000800002).

CASTELLO, G.; COSTANTINI, S.; SCALA, S. Targeting the inflammation in HCV-associated hepatocellular carcinoma: a role in the prevention and treatment. **J Transl Med**, 8, p. 109, Nov 3 2010.

CHACKO, B.; PETER, J. V.; THARYAN, P.; JOHN, G. *et al.* Pressure-controlled versus volume-controlled ventilation for acute respiratory failure due to acute lung injury (ALI) or acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Cochrane Database Syst Rev**, 1, p. Cd008807, Jan 14 2015.

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.

COX, C. E.; CARSON, S. S.; ELY, E. W.; GOVERT, J. A. *et al.* Effectiveness of medical resident education in mechanical ventilation. **Am J Respir Crit Care Med**, 167, n. 1, p. 32-38, Jan 1 2003.

CURLEY, G. F.; LAFFEY, J. G.; ZHANG, H.; SLUTSKY, A. S. Biotrauma and Ventilator-Induced Lung Injury: Clinical Implications. **Chest**, 150, n. 5, p. 1109-1117, Nov 2016.

DAMASCENO, M. P. C. D. **Ventilação Mecânica no Brasil**. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbti/v18n3/v18n3a02>.

DANGELO, Jose Geraldo; FATTINI, Carlo Americo. **Anatomia humana basica**. 2.ed. Sao Paulo: Atheneu 2003. 184 p.

DE BARROS, A. F.; DE BARROS, L. C.; SANGEAN, M. C.; VEGA, J. M. Analysis of ventilation and hemodynamic changes resulting from noninvasive bilevel pressure mechanical ventilation applied to patients with congestive heart failure. **Arq Bras Cardiol**, 88, n. 1, p. 96-103, Jan 2007.

DE SOUZA, A. B. F.; CHIRICO, M. T. T.; CARTELLE, C. T.; DE PAULA COSTA, G. *et al.* High-Fat Diet Increases HMGB1 Expression and Promotes Lung Inflammation in Mice Subjected to Mechanical Ventilation. **Oxid Med Cell Longev**, 2018, p. 7457054, 2018.

DE WIT, M. Monitoring of patient-ventilator interaction at the bedside. **Respir Care**, 56, n. 1, p. 61-72, Jan 2011.

DEL SORBO, L.; SLUTSKY, A. S. Ventilatory support for acute respiratory failure: new and ongoing pathophysiological, diagnostic and therapeutic developments. **Curr Opin Crit Care**, 16, n. 1, p. 1-7, Feb 2010.

DELLA ROCCA, G.; COCCIA, C. Acute lung injury in thoracic surgery. **Curr Opin Anaesthesiol**, 26, n. 1, p. 40-46, Feb 2013.

DEMPSEY, J. A.; FREGOSI, R. F. Adaptability of the pulmonary system to changing metabolic requirements. **Am J Cardiol**, 55, n. 10, p. 59d-67d, Apr 26 1985.

DENNISON, C. R.; MENDEZ-TELLEZ, P. A.; WANG, W.; PRONOVOST, P. J. *et al.* Barriers to low tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome: survey development, validation, and results. **Crit Care Med**, 35, n. 12, p. 2747-2754, Dec 2007.

DONAHOE, M. Basic ventilator management: lung protective strategies. **Surg Clin North Am**, 86, n. 6, p. 1389-1408, Dec 2006.

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.

DUFLO, F.; DEBON, R.; GOUDABLE, J.; CHASSARD, D. *et al.* Alveolar and serum oxidative stress in ventilator-associated pneumonia. **Br J Anaesth**, 89, n. 2, p. 231-236, Aug 2002.

EPSTEIN, S. K. Optimizing patient-ventilator synchrony. **Semin Respir Crit Care Med**, 22, n. 2, p. 137-152, 2001.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. **Nat Rev Neurosci**, 7, n. 3, p. 232-242, Mar 2006.

FRANK, J. A.; MATTHAY, M. A. Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. **Crit Care**, 7, n. 3, p. 233-241, Jun 2003.

FRIJHOFF, J.; WINYARD, P. G.; ZARKOVIC, N.; DAVIES, S. S. *et al.* Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. **Antioxid Redox Signal**, 23, n. 14, p. 1144-1170, Nov 10 2015.

FROES, S. D. P.; SOUZA, A. B. F.; MATOS, N. A.; PHILIPS, N. E. *et al.* Intranasal instillation of distilled water, hypertonic saline and sodium bicarbonate promotes redox imbalance and acute lung inflammation in adult mice. **Respir Physiol Neurobiol**, 266, p. 27-32, Aug 2019.

GAGGAR, A.; WEATHINGTON, N. Bioactive extracellular matrix fragments in lung health and disease. **J Clin Invest**, 126, n. 9, p. 3176-3184, Sep 1 2016.

GATTINONI, L.; MARINI, J. J.; COLLINO, F.; MAIOLO, G. *et al.* The future of mechanical ventilation: lessons from the present and the past. **Crit Care**, 21, n. 1, p. 183, Jul 12 2017.

GATTINONI, L.; PROTTI, A.; CAIRONI, P.; CARLESSO, E. Ventilator-induced lung injury: the anatomical and physiological framework. **Crit Care Med**, 38, n. 10 Suppl, p. S539-548, Oct 2010.

GEDDES, L. A. The history of artificial respiration. **IEEE Eng Med Biol Mag**, 26, n. 6, p. 38-41, Nov-Dec 2007.

GENTILE, M. A. Cycling of the mechanical ventilator breath. **Respir Care**, 56, n. 1, p. 52-60, Jan 2011.

GHABACH, M. B.; EL HAJJ, E. M.; EL DIB, R. D.; RKAIBY, J. M. *et al.* Ventilation of Nonparalyzed Patients Under Anesthesia with Laryngeal Mask Airway, Comparison of Three Modes of Ventilation: Volume Controlled Ventilation, Pressure Controlled Ventilation, and Pressure Controlled Ventilation-volume Guarantee. **Anesth Essays Res**, 11, n. 1, p. 197-200, Jan-Mar 2017.

GLASS, M. L. **MODULADORES DA CURVA DE DISSOCIAÇÃO OXIGÊNIO-HEMOGLOBINA E VENTILAÇÃO DURANTE O EXERCÍCIO**. 2019. Disponível em: [http://www.gruponitro.com.br/atendimento-a-profissionais/%23/pdfs/artigos/multidisciplinares/moduladores-curva-oxigenio-hemoglobina-exercicio\\_ok.pdf](http://www.gruponitro.com.br/atendimento-a-profissionais/%23/pdfs/artigos/multidisciplinares/moduladores-curva-oxigenio-hemoglobina-exercicio_ok.pdf).

GOMES, P. M.; SÁ, R. W. M.; AGUIAR, G. L.; PAES, M. H. S. *et al.* Chronic high-sodium diet intake after weaning lead to neurogenic hypertension in adult Wistar rats. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 5655, 2017-07-18 2017. OriginalPaper.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. *In: Mol Med*, 2011. v. 17, p. 293-307.

GURSEL, G.; AYDOGDU, M. [Patient-ventilator interaction]. **Tuberk Toraks**, 57, n. 4, p. 453-465, 2009.

GUYTON, Arthur C. **Fisiologia humana**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan c2008. 563 p.

HAHN, G. F.; OLIVEIRA, J. R. D.; BOCK, P. M. The role of factor 2 erythroid nuclear factor 2 (Nrf2) in diabetes mellitus. 2017 2017.

HAITSMA, J. J. Physiology of mechanical ventilation. **Crit Care Clin**, 23, n. 2, p. 117-134, vii, Apr 2007.

HAMMERSCHMIDT, S.; SANDVOSS, T.; GESSNER, C.; SCHAUER, J. *et al.* High in comparison with low tidal volume ventilation aggravates oxidative stress-induced lung injury. **Biochim Biophys Acta**, 1637, n. 1, p. 75-82, Jan 20 2003.

HOPPER, K. Respiratory Acid-Base Disorders in the Critical Care Unit. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, 47, n. 2, p. 351-357, Mar 2017.

HUANG, J. L.; HUANG, J.; DUAN, Z. H.; WEI, J. *et al.* Th2 predominance and CD8+ memory T cell depletion in patients with severe acute respiratory syndrome. **Microbes Infect**, 7, n. 3, p. 427-436, Mar 2005.

IZQUIERDO-GARCIA, J. L.; NAZ, S.; NIN, N.; ROJAS, Y. *et al.* A Metabolomic Approach to the Pathogenesis of Ventilator-induced Lung Injury. **Anesthesiology**, 120, n. 3, p. 694-702, Mar 2014.

JANSSENS, J. P.; PACHE, J. C.; NICOD, L. P. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. **Eur Respir J**, 13, n. 1, p. 197-205, Jan 1999.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, 8, n. 9-10, p. 1865-1879, Sep-Oct 2006.

JÚNIOR, D. R. D. A.; SOUZA, R. B. D.; SANTOS, S. A. D.; ANDRADE, D. R. D. **Oxygen free radicals and pulmonary disease**. vol.31 no.1, São Paulo, 2019. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132005000100011&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132005000100011&script=sci_arttext&tlng=en).

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

KALLET, R. H.; CAMPBELL, A. R.; ALONSO, J. A.; MORABITO, D. J. *et al.* The effects of pressure control versus volume control assisted ventilation on patient work of breathing in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Respir Care**, 45, n. 9, p. 1085-1096, Sep 2000.

KAVAZIS, A. N.; DERUISSEAU, K. C.; MCCLUNG, J. M.; WHIDDEN, M. A. *et al.* Diaphragmatic proteasome function is maintained in the ageing Fisher 344 rat. **Exp Physiol**, 92, n. 5, p. 895-901, Sep 2007.

KOEPPEN, Bruce M; STANTON, Bruce A; BERNE, Robert M.; LEVY, Matthew N. **Berne & Levy fisiologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Mosby, Elsevier, 2009. xiii, 844 p.

KOH, S. O. Mode of mechanical ventilation: volume controlled mode. **Crit Care Clin**, 23, n. 2, p. 161-167, viii, Apr 2007.

LAMIA, B.; MOLANO, L. C.; MUIR, J. F.; CUVELIER, A. [Cardiopulmonary interactions in the course of mechanical ventilation]. **Rev Mal Respir**, 33, n. 10, p. 865-876, Dec 2016.

LASSEN, H. C. A preliminary report on the 1952 epidemic of poliomyelitis in Copenhagen with special reference to the treatment of acute respiratory insufficiency. **Lancet**, 1, n. 6749, p. 37-41, Jan 3 1953.

LI, L. F.; LAI, Y. T.; CHANG, C. H.; LIN, M. C. *et al.* Neutrophil elastase inhibitor reduces ventilation-induced lung injury via nuclear factor-kappaB and NF-kappaB repressing factor in mice. **Exp Biol Med (Maywood)**, 239, n. 8, p. 1045-1057, Aug 2014.

LICKER, M.; FAUCONNET, P.; VILLIGER, Y.; TSCHOPP, J. M. Acute lung injury and outcomes after thoracic surgery. **Curr Opin Anaesthesiol**, 22, n. 1, p. 61-67, Feb 2009.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem Biol Interact**, 224, p. 164-175, Dec 5 2014.

LUU, H. N.; WEN, W.; LI, H.; DAI, Q. *et al.* Are dietary antioxidant intake indices correlated to oxidative stress and inflammatory marker levels? **Antioxid Redox Signal**, 22, n. 11, p. 951-959, Apr 10 2015.

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.

MACKLIN, M. T.; MACKLIN, C. C. MALIGNANT INTERSTITIAL EMPHYSEMA OF THE LUNGS AND MEDIASTINU... : Medicine. **Medicine**, 23, n. 4, p. 281-358, 1944.

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

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 1974.

MARUSCAK, A. A.; VOCKEROTH, D. W.; GIRARDI, B.; SHEIKH, T. *et al.* Alterations to surfactant precede physiological deterioration during high tidal volume ventilation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 294, n. 5, p. L974-983, May 2008.

MASOUMI, B.; AZIZKHANI, R.; EMAM, G. H.; ASGARZADEH, M. *et al.* Predictive Value of Tracheal Rapid Ultrasound Exam Performed in the Emergency Department for Verification of Tracheal Intubation. **Open Access Maced J Med Sci**, 5, n. 5, p. 618-623, Aug 15 2017.

MATOS, N. A.; SILVA, J. F.; DAMASCENO, K. A.; CASSALI, G. D. *et al.* Proteinase-activated receptor 2 blockade impairs CCL11- or allergen-induced eosinophil recruitment in experimental pleurisy. **Eur J Pharmacol**, 740, p. 627-633, Oct 5 2014.

MORAES, L.; SILVA, P. L.; THOMPSON, A.; SANTOS, C. L. *et al.* Impact of Different Tidal Volume Levels at Low Mechanical Power on Ventilator-Induced Lung Injury in Rats. **Front Physiol**, 9, 2018.

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; COLOMBARI, E.; WEST, G. H. *et al.* Inhibitory input from slowly adapting lung stretch receptors to retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. **J Physiol**, 580, n. Pt 1, p. 285-300, Apr 1 2007.

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; DAMASCENO, R. S.; FALQUETTO, B. *et al.* Central chemoreceptors and neural mechanisms of cardiorespiratory control. **Braz J Med Biol Res**, 44, n. 9, p. 883-889, Sep 2011.

PAN, Z. Z.; PARKYN, L.; RAY, A.; RAY, P. Inducible lung-specific expression of RANTES: preferential recruitment of neutrophils. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 279, n. 4, p. L658-666, Oct 2000.

PATWA, A.; SHAH, A. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. **Indian J Anaesth**, 59, n. 9, p. 533-541, Sep 2015.

PENA, K. B.; RAMOS, C. 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. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 11, p. 3207-3217, 2016.

PERL, M.; CHUNG, C. S.; PERL, U.; BIFFL, W. L. *et al.* Beneficial versus detrimental effects of neutrophils are determined by the nature of the insult. **J Am Coll Surg**, 204, n. 5, p. 840-852; discussion 852-843, May 2007.

PETTENUZZO, T.; FAN, E. 2016 Year in Review: Mechanical Ventilation. **Respir Care**, 62, n. 5, p. 629-635, May 2017.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **Int J Biomed Sci**, 4, n. 2, p. 89-96, Jun 2008.

POWERS, Scott K.; HOWLEY, Edward T. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 5. ed. Barueri: Manole, 2005. 576 p.

POWERS, S. K.; LAWLER, J.; CRISWELL, D.; SILVERMAN, H. *et al.* Regional metabolic differences in the rat diaphragm. **J Appl Physiol (1985)**, 69, n. 2, p. 648-650, Aug 1990.

POWERS, S. K.; WIGGS, M. P.; SOLLANEK, K. J.; SMUDER, A. J. Ventilator-induced diaphragm dysfunction: cause and effect. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 305, n. 5, p. R464-477, Sep 2013.

PRCHAL, J. T. Polycythemia vera and other primary polycythemias. **Curr Opin Hematol**, 12, n. 2, p. 112-116, Mar 2005.

PRELLA, M.; FEIHL, F.; DOMENIGHETTI, G. Effects of short-term pressure-controlled ventilation on gas exchange, airway pressures, and gas distribution in patients with acute lung injury/ARDS: comparison with volume-controlled ventilation. **Chest**, 122, n. 4, p. 1382-1388, Oct 2002.

QUINN, D. A.; DU, H. K.; THOMPSON, B. T.; HALES, C. A. Amiloride analogs inhibit chronic hypoxic pulmonary hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**, 157, n. 4 Pt 1, p. 1263-1268, Apr 1998.

QUINN, D. A.; MOUFARREJ, R. K.; VOLOKHOV, A.; HALES, C. A. Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury. **J Appl Physiol (1985)**, 93, n. 2, p. 517-525, Aug 2002.

RAMIREZ, J. M.; GARCIA, A. J., 3RD; ANDERSON, T. M.; KOSCHNITZKY, J. E. *et al.* Central and peripheral factors contributing to obstructive sleep apneas. **Respir Physiol Neurobiol**, 189, n. 2, p. 344-353, Nov 1 2013.

RANIERI, V. M.; SUTER, P. M.; TORTORELLA, C.; DE TULLIO, R. *et al.* Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. **Jama**, 282, n. 1, p. 54-61, Jul 7 1999.

REDDY, S. P.; HASSOUN, P. M.; BROWER, R. Redox imbalance and ventilator-induced lung injury. **Antioxid Redox Signal**, 9, n. 11, p. 2003-2012, Nov 2007.

RICARD, J. D.; DREYFUSS, D.; SAUMON, G. Ventilator-induced lung injury. **Eur Respir J Suppl**, 42, p. 2s-9s, Aug 2003.

ROSANNA, D. P.; SALVATORE, C. Reactive oxygen species, inflammation, and lung diseases. **Curr Pharm Des**, 18, n. 26, p. 3889-3900, 2012.

ROTTA, A. T.; STEINHORN, D. M. Conventional mechanical ventilation in pediatrics. **J Pediatr (Rio J)**, 83, n. 2 Suppl, p. S100-108, May 2007.

SA, R. W.; HAIBARA, A. S.; GOMES, P. M.; AGUIAR, G. L. *et al.* Changes in cardiovascular responses to chemoreflex activation of rats recovered from protein restriction are not related to AT1 receptors. **Exp Physiol**, 102, n. 1, p. 34-47, Jan 1 2017.

SCHMEKEL, B.; KARLSSON, S. E.; LINDEN, M.; SUNDSTROM, C. *et al.* Myeloperoxidase in human lung lavage. I. A marker of local neutrophil activity. **Inflammation**, 14, n. 4, p. 447-454, Aug 1990.

SCHMIDT, M. F. S.; AMARAL, A.; FAN, E.; RUBENFELD, G. D. Driving Pressure and Hospital Mortality in Patients Without ARDS: A Cohort Study. **Chest**, 153, n. 1, p. 46-54, Jan 2018.

SCHOLPP, J.; SCHUBERT, J. K.; MIEKISCH, W.; GEIGER, K. Breath markers and soluble lipid peroxidation markers in critically ill patients. **Clin Chem Lab Med**, 40, n. 6, p. 587-594, Jun 2002.

SCHONHOFER, B. [Mechanical Ventilation - Essentials of 4 German Guidelines]. **Dtsch Med Wochenschr**, 143, n. 11, p. 793-796, Jun 2018.

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.

SMITH, J. C.; BUTERA, R. J.; KOSHIYA, N.; DEL NEGRO, C. *et al.* Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model. **Respir Physiol**, 122, n. 2-3, p. 131-147, Sep 2000.

SOCOLOVSKY, M. Molecular insights into stress erythropoiesis. **Curr Opin Hematol**, 14, n. 3, p. 215-224, May 2007.

SOMERSON, S. J.; SICILIA, M. R. Historical perspectives on the development and use of mechanical ventilation. **Aana j**, 60, n. 1, p. 83-94, Feb 1992.

ST-JOHN, W. M.; PATON, J. F. Role of pontile mechanisms in the neurogenesis of eupnea. **Respir Physiol Neurobiol**, 143, n. 2-3, p. 321-332, Nov 15 2004.

STAEHR-RYE, A. K.; MEYHOFF, C. S.; SCHEFFENBICHLER, F. T.; VIDAL MELO, M. F. *et al.* High intraoperative inspiratory oxygen fraction and risk of major respiratory complications. **Br J Anaesth**, 119, n. 1, p. 140-149, Jul 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.

SUN, Z. T.; YANG, C. Y.; MIAO, L. J.; ZHANG, S. F. *et al.* Effects of mechanical ventilation with different tidal volume on oxidative stress and antioxidant in lung. **J Anesth**, 29, n. 3, p. 346-351, Jun 2015.

SUZUE, T. Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. **J Physiol**, 354, p. 173-183, Sep 1984.

THOMPSON, B. T.; CHAMBERS, R. C.; LIU, K. D. Acute Respiratory Distress Syndrome. *In: N Engl J Med*. United States, 2017. v. 377, p. 1904-1905.

TIMMERMANS, K.; VAN DER WAL, S. E.; VANEKER, M.; VAN DER LAAK, J. A. *et al.* IL-1 $\beta$  processing in mechanical ventilation-induced inflammation is dependent on neutrophil factors rather than caspase-1. **Intensive Care Med Exp**, 1, n. 1, p. 27, Dec 2013.

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.

WALLACE, M. J.; PROBYN, M. E.; ZAHRA, V. A.; CROSSLEY, K. *et al.* Early biomarkers and potential mediators of ventilation-induced lung injury in very preterm lambs. **Respir Res**, 10, p. 19, Mar 10 2009.

WANG, W. F.; LIU, S.; XU, B. A study of the protective effect and mechanism of ketamine on acute lung injury induced by mechanical ventilation. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 21, n. 6, p. 1362-1367, Mar 2017.

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.

WEST, John B. **Fisiologia Respiratória**. 9. ed. Barueri,SP: Artmed 2013. x,199 p

WOODS, S. J.; WAITE, A. A.; O'DEA, K. P.; HALFORD, P. *et al.* Kinetic profiling of in vivo lung cellular inflammatory responses to mechanical ventilation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 308, n. 9, p. L912-921, May 1 2015.

WU, N. C.; LIAO, F. T.; CHENG, H. M.; SUNG, S. H. *et al.* Intravenous superoxide dismutase as a protective agent to prevent impairment of lung function induced by high tidal volume ventilation. **BMC Pulm Med**, 17, n. 1, p. 105, Jul 26 2017.

YILDIZ, C.; PALANIYAR, N.; OTULAKOWSKI, G.; KHAN, M. A. *et al.* Mechanical ventilation induces neutrophil extracellular trap formation. **Anesthesiology**, 122, n. 4, p. 864-875, Apr 2015.

ZIMMERMAN, J. E.; DUNBAR, B. S.; KLINGENMAIER, C. H. Management of subcutaneous emphysema, pneumomediastinum, and pneumothorax during respirator therapy. **Crit Care Med**, 3, n. 2, p. 69-73, Mar-Apr 1975.

## 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-II, Sala 29  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370  
Email: [ceua@ccropo.ufop.br](mailto:ceua@ccropo.ufop.br)



**OFÍCIO CEUA N°. 023/2018, de 08 de fevereiro de 2018**

**Ilustríssimo(a) Senhor(a)**

**Professor(a) Doutor(a) Frank Silva Bezerra**

**DECBI/UFOP**

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo n°. **2017/42**, intitulado **"Efeitos da ventilação mecânica com diferentes volumes correntes sobre desequilíbrio redox e na resposta inflamatória pulmonar de ratos Wistar saudáveis)"**.

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA n° 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do site da CEUA.

Atenciosamente,

**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 09.005 - High tidal volume induces oxidative stress and pulmonary inflammation in Wistar rats submitted to mechanical ventilation - Cândido LS, Matos NA, Castro TF, Paula LC, Chirico RN, Cangussú SD, Bezerra FS, Departamento de Ciências Biológicas - 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. Hernandes Faustino de Carvalho  
Presidente da FeSBE

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



### Anexo 3. Certificado de Menção Honrosa



## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho 09.005 - High tidal volume induces oxidative stress and pulmonary inflammation in Wistar rats submitted to mechanical ventilation - Cândido LS, Matos NA, Castro TF, Paula LC, Chirico RN, Cangussú SD, Bezerra FS, Departamento de Ciências Biológicas - UFOP foi contemplado com MENÇÃO HONROSA 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. Hernandes Faustino de Carvalho  
Presidente da FeSBE

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

