

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Escola de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição PPGSN

---

**Dissertação**

---

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO SUSPIRO EM  
RATOS Wistar ADULTOS SAUDÁVEIS  
SUBMETIDOS À VENTILAÇÃO MECÂNICA**

*Andrea Cristiane Lopes da Silva*

Ouro Preto  
2019





**Universidade Federal de Ouro Preto**

**Escola de Nutrição**

**Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição**

**AValiação dos efeitos do suspiro em ratos wistar adultos  
saúdáveis submetidos à ventilação mecânica**

Andrea Cristiane Lopes da Silva

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

Co-orientadora: Dra. Natália Alves de Matos

Ouro Preto, Minas Gerais

Agosto, 2019

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586a Silva, Andrea Cristiane Lopes da .  
Avaliação dos efeitos do suspiro em ratos Wistar adultos saudáveis submetidos à ventilação mecânica. [manuscrito] / Andrea Cristiane Lopes da Silva. - 2019.  
83 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra.

Coorientadora: Dra. Natália Alves Matos.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto.

Escola de Nutrição. Programa de Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Saúde e Nutrição.

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

CDU 615.816

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



UFOP



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
Escola de Nutrição – ENUT  
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição



### ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos trinta dias do mês de agosto de dois mil e dezenove, às nove horas, no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Andrea Cristiane Lopes da Silva**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelos professores Akinori Cardozo Nagato (UFJF), Maria Lúcia Pedrosa (UFOP), Natália Alves de Matos (UFOP) e Frank Silva Bezerra (UFOP). Dando início ao Exame, a aluna apresentou sua Dissertação de Mestrado intitulada: **“Avaliação dos efeitos do suspiro em ratos Wistar adultos saudáveis submetidos à ventilação mecânica”**. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento do Programa. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:



APROVAR



REPROVAR

*Akinori Cardozo Nagato*  
Prof. Akinori Cardozo Nagato (UFJF),  
Examinador Externo.

*Maria Lúcia Pedrosa*  
Profa. Maria Lúcia Pedrosa (UFOP),  
Examinadora Interna.

*Natália Alves de Matos*  
Dra. Natália Alves de Matos (UFOP),  
Coorientadora.

*Frank Silva Bezerra*  
Prof. Frank Silva Bezerra (UFOP),  
Orientador.

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho à Deus e à toda a minha família, minha base e meu alicerce.**

## AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Frank Silva Bezerra pelo grande exemplo em sempre buscar aprimoramento profissional, por transmitir seus conhecimentos, pelo apoio e confiança ao longo desse projeto;

À minha co-orientadora Dra. Natália Alves de Matos agradeço imensamente pelo exemplo de dedicação em tudo o que você faz, pela acessibilidade em transmitir os conhecimentos, pela orientação científica e confiança ao longo dessa desta jornada. Só Deus sabe o tanto que você se doa e torço para que você colha os frutos de tudo o que você semeia. Tenho muito orgulho de você;

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição pelo apoio e estímulo ao desenvolvimento profissional;

Ao Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx) pelo apoio, contribuição científica e oportunidade de aprendizado, em especial Gabriel, Leandro, Rafael, Michel, Laisy, Mônica e Matheus;

Aos doutorandos Ana Beatriz e Thalles agradeço pela dedicação tão bonita que vocês têm e pela garra em prestar auxílio aos demais da equipe. Tenho certeza do sucesso de vocês dois;

Aos professores do LAFEx Sílvia Dantas Cangussú e Luiz Eduardo de Sousa pelas contribuições;

À Banca Examinadora pela atenção dispensada na leitura desse trabalho e pelas contribuições valiosas fornecidas;

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

Aos professores da Pós-graduação e aos secretários do programa, que de forma direta e indireta contribuíram para meu aprimoramento profissional;

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP;

Ao Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ouro Preto, toda equipe de profissionais, voluntários e familiares que auxiliaram neste projeto;

Aos laboratórios colaboradores, Laboratório de Imunopatologia (LIMP), Laboratório de Imunopatologia (Labiin) e Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC);

Ao apoio financeiro concedido pela Nova Biomedical;

Ao Jacques Gabriel pelo apoio, ensinamentos, disponibilidade em discutir os assuntos e contribuição essencial na elaboração e execução da pesquisa, dissertação e artigo.

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

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

Agradeço à Deus pelo privilégio de fazer o mestrado que se tornou uma experiência de grande valor em minha vida;

Agradeço pela grande alegria do nascimento da minha primeira filha Lavínia;

Agradeço à meu pai Aloísio meu exemplo de vida! À cada um dos meus irmãos e familiares;

Agradeço ao Gabriel pelas longas conversas, passeios e pela atenção de sempre dispensada a mim e à Lavínia;

Agradeço à cada pessoa que mesmo com pequenas atitudes contribuíram indiretamente para a realização do mestrado;

Ofereço o meu mestrado à querida Verinha cuja vida nos foi tirada tão precocemente;

Ofereço o meu mestrado aos inúmeros amigos e pacientes que perdi por ocasião da tragédia de Brumadinho.

“Sou parte de uma equipe. Então quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas!”

Ayrton Sena



## RESUMO

**Introdução:** A Ventilação Mecânica Invasiva (VMI) é uma ferramenta utilizada no tratamento de pacientes com insuficiência respiratória aguda ou crônica, sendo considerada um recurso não fisiológico, a VMI pode causar vários distúrbios metabólicos como acidose e alcalose respiratória. Entretanto, na prática clínica, existem técnicas como o suspiro e a insuflação gradual, que visam o recrutamento alveolar e, conseqüentemente, promovem possíveis efeitos protetores nos pulmões. Neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar os efeitos do suspiro sobre o estresse oxidativo e a resposta inflamatória pulmonar em ratos adultos saudáveis Wistar submetidos à VMI. **Métodos:** trinta e um ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: controle (GC), ventilação mecânica (GVM), ventilação mecânica com 20 suspiros/hora (GVM20) e ventilação mecânica com 40 suspiros/hora (GVM40). Os animais do GC foram mantidos em ventilação espontânea por 1h, e o GVM, GVM20 e GVM40 foram sedados, anestesiados, curarizados e ventilados mecanicamente por 1h com volume corrente de 7 mL/kg, uma frequência respiratória de 80 ciclos/minuto e uma pressão positiva expiratória final (PEEP) de 3 cmH<sub>2</sub>O. Após o término do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e o lavado broncoalveolar (LBA), o sangue arterial e os pulmões foram coletados para as análises imunoenzimáticas, histológicas e bioquímicas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPadPrism. Os dados foram expressos como média ± EPM ou mediana, valor mínimo e máximo e o p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** Não houve alterações nos parâmetros hemodinâmicos entre os grupos analisados. Em relação a gasometria arterial, no final da ventilação mecânica, não foram observadas alterações na saturação de O<sub>2</sub> e no pH sanguíneo entre os grupos experimentais. Os animais do GVM40 apresentaram maior pressão parcial de oxigênio (PO<sub>2</sub>) e menor pressão parcial de dióxido de carbono (PCO<sub>2</sub>) em relação ao GC. Os níveis de bicarbonato (HCO<sub>3</sub>) no GVM20 foram menores em comparação ao GC. A relação entre PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> foi maior em GVM e GVM40 em relação ao GC. O influxo de células totais no LBA foi maior no GVM em relação ao GC, assim como o influxo de neutrófilos, todavia, houve uma diminuição dos neutrófilos no GVM40 em relação à GVM. A análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) mostrou maior oxidação de lipídios no GVM em relação ao GC, GVM20 e GVM40. A oxidação de proteínas foi maior no GVM quando comparado ao GVM40. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi maior no GVM quando comparado aos GC, GVM20 e GVM40. A atividade da enzima catalase (CAT) também foi maior no GVM em relação aos GC, GVM20 e GVM40. Em relação aos marcadores inflamatórios CCL2, CCL3, CCL5 não houve diferença entre os grupos analisados. No entanto, houve aumento dos níveis de IL-1, IL-6 e TNF em GVM em relação ao GC e uma diminuição em GVM20 e GVM40 em relação ao GVM. **Conclusão:** Nossos dados sugerem que o uso do suspiro desempenha um papel protetor, uma vez que reduziu o desequilíbrio redox e a inflamação pulmonar causada pela VM.

**Palavras-chave:** ventilação mecânica, suspiro, estresse oxidativo, inflamação pulmonar.

## ABSTRACT

**Introduction:** Mechanical ventilation (MV) is a tool used in the treatment of patients with acute or chronic respiratory failure, being considered a non-physiological resource, MV can cause several metabolic disorders such as metabolic disorders like respiratory acidosis and alkalosis. However, in clinical practice, there are techniques such as sigh and gradual insufflation, which aim alveolar recruitment and, consequently, promote possible protective effects on the lungs. In this context, our study analyzed the effects of sigh on oxidative stress and pulmonary inflammatory response in healthy adult Wistar rats submitted to MV. **Methods:** Thirty-one male Wistar rats were divided into four groups: control (CG), mechanical ventilation (MVG), mechanical ventilation with 20 sighs/hour (MV20G) and mechanical ventilation with 40 sighs/hour (MV40G). The CG animals were maintained with spontaneous ventilation for 1h, and the MVG, MV20G, and MV40G were sedated, anesthetized, curarized and mechanically ventilated for 1h with a tidal volume of 7 mL/kg, a respiratory rate of 80 cycles/minute and a positive end-expiratory pressure (PEEP) of 3 cmH<sub>2</sub>O. At the end of the experimental protocol, the animals were euthanized and bronchoalveolar lavage (BAL), arterial blood and lungs were collected for immunoenzymatic, histological and biochemical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad prism. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM or median, minimum and maximum values, and  $p < 0.05$  was considered statistically significant. **Results:** There were no changes in hemodynamic parameters between the analyzed groups. Regarding arterial blood gas analysis, at the end of mechanical ventilation, no changes in O<sub>2</sub> saturation and blood pH were observed between the experimental groups. MV40G presented higher partial oxygen pressure (PO<sub>2</sub>) and lower carbon dioxide partial pressure (PCO<sub>2</sub>) (mmHg) compared to CG. Bicarbonate (HCO<sub>3</sub>) (mmol/L) levels in MV20G were lower compared to CG. The relationship between PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> was higher in MVG and MV40G compared to CG. The total cell influx in BAL was higher in MVG than in CG, as well as in neutrophil influx. However, there was a decrease in neutrophils in MV40G compared to MVG. Analysis of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) showed a higher lipid oxidation in MVG compared to CG, MV20G, and MV40G. Protein oxidation (nmol/mg PTN) was higher in MVG compared to MV40G. The activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) was higher in MVG when compared to CG, MV20G, and MV40G. The catalase (CAT) enzyme activity was also higher in MVG compared to CG, MV20G, and MV40G. In regards to the inflammatory markers CCL2 and CCL3, there was no difference between the analyzed groups. However, IL-1, IL-6, and TNF showed an increase in MVG levels compared to CG and a decrease in MV20G and MV40G compared to MVG. **Conclusion:** Our data suggest that the use of sigh plays a protective role as it reduced redox imbalance and pulmonary inflammation caused by MV.

**Keywords:** mechanical ventilation, sigh, oxidative stress, pulmonary inflammation

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações locais e sistêmicas causadas pela ventilação mecânica. ....	21
Figura 2. Crescente publicações sobre Disfunção diafragmática induzidas pelo ventilador (DDIV) .....	22
Figura 3. Atitudes preventivas para reduzir danos causados pela VMI. ....	25
Figura 4. Efeitos mecânicos da ventilação com PEEP na circulação cardiopulmonar. ....	26
Figura 5. Anatomia do sistema nervoso central referente ao controle do centro respiratório: complexo de pré-Bötzinger e Bötzinger. ....	28
Figura 6. Ilustração esquemática da sequência da dinâmica alveolar e sua restauração pelo suspiro após lesão pulmonar aguda induzida, juntamente com a normatização das trocas gasosas. ....	30
Figura 7. Análise estereológica das seções de pulmão e fotomicrografias de cortes do pulmão corado em H&E. ....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Curva padrão de albumina. ....	38
Tabela 2. Reagentes utilizados para a análise da atividade da Superóxido Dismutase .....	39
Tabela 3. Curva padrão para análise de glutatona total. ....	40
Tabela 4: Reagentes para a análise de Glutaciona .....	41
Tabela 5. Hemodinâmica dos animais submetidos a ventilação mecânica .....	46
Tabela 6. Gasometria arterial e função pulmonar dos animais submetidos a ventilação mecânica.....	47
Tabela 7. Efeitos da ventilação mecânica sobre o recrutamento de células para o lavado broncoalveolar. ....	48
Tabela 8. Biomarcadores do estresse oxidativo no parênquima pulmonar dos animais submetidos a ventilação mecânica.....	49
Tabela 9. Marcadores inflamatórios no parênquima pulmonar dos animais submetidos a ventilação mecânica .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

µm: Micrômetro

µL: Microlitro

BHT: Butil hidróxitolueno

CAT: Catalase

CCA: Centro de Ciência Animal

CCL2: (*C-C motif*) *ligand 2* ou proteína quimiotática de monócitos 1

CCL3: (*C-C motif*) *ligand 3* ou proteína inflamatória de macrófagos 1- alfa

CCL5: (*C-C motif*) *ligand 5* ou RANTES

DDVI: Disfunção diafragmática induzida pelo ventilador

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNPH: 2,4- difenilhidrazina

DTNB: Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

ERO: Espécie reativa de oxigênio

FC: Frequência cardíaca

FiO<sub>2</sub>: Fração inspirada de oxigênio

FR: Frequência respiratória

GSH: Glutathiona reduzida

GSSG: Glutathiona oxidada

H&E: hematoxilina-eosina

i.p.: Intraperitoneal

irpm: incursões respiratórias por minuto

i.v.: Intravenoso

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

LAFEx: Laboratório de Fisiopatologia Experimental

LBA: Lavado broncoalveolar

LPA: Lesão pulmonar aguda

LPVI: Lesão pulmonar induzida pelo ventilador

MR: Manobra de recrutamento

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

NADPH: β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'-fosfato

nm: Nanômetro

PAM: Pressão arterial média  
PAP: Pressão arterial pulsátil  
PCO<sub>2</sub>: Pressão parcial de dióxido de carbono  
PEEP: Pressão positiva expiratória final  
pH: Potencial hidrogeniônico  
PO<sub>2</sub>: Pressão parcial de oxigênio  
Pp: Número de pontos  
Pt: Total de pontos do sistema teste  
PTN: proteína  
rpm: Rotações por minuto  
SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
SO<sub>2</sub>: Saturação do oxigênio  
SOD: Superóxido dismutase  
SSA: Ácido sulfosalicílico  
TBA: Ácido tiobarbitúrico  
TBARS: do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances* (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)  
TCA: Ácido tricloroacético  
TEA: Trietanolamina  
TNF: fator de necrose tumoral  
UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto  
VC: Volume corrente  
VCV: Ventilação com volume controlado  
VM: volume minuto  
VMI: Ventilação Mecânica Invasiva  
Vv [a]: Densidade de volume de alvéolo  
Vv [as]: Densidade de volume de septo alveolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1	Anatomia e Fisiologia do Sistema Respiratório .....	18
2.2	A Ventilação Mecânica.....	19
2.3	Lesão Pulmonar induzida pelo ventilador.....	23
2.4	Pressão Positiva Expiratória Final .....	26
2.5	Suspiro .....	27
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
4.1	Objetivo Geral .....	32
4.2	Objetivos Específicos.....	32
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
5.1	Animais .....	33
5.2	Grupos experimentais .....	33
5.3	Ventilação espontânea .....	33
5.4	Ventilação Mecânica.....	34
5.4.1	Sedação, analgesia e bloqueio neuromuscular .....	34
5.4.2	Suporte ventilatório.....	34
5.5	Avaliações de parâmetros cardiovasculares e coleta de sangue .....	35
5.5.1	Canulação da artéria femoral.....	35
5.5.2	Registro direto da PAM e FC .....	35
5.5.3	Coleta de sangue .....	35
5.6	Eutanásia .....	36
5.7	Coleta do lavado broncoalveolar (LBA).....	36
5.7.1	Contagem total e diferencial de células do LBA.....	36
5.8	Coleta dos pulmões.....	37
5.8.1	Processamento tecidual.....	37
5.8.2	Análises Estereológicas do parênquima pulmonar .....	37
5.8.3	Homogenato pulmonar.....	38
5.9	Biomarcadores do Estresse Oxidativo .....	38
5.9.1	Proteínas Totais .....	38
5.9.2	Atividade da superóxido Dismutase .....	39
5.9.3	Atividade da Catalase .....	39
5.9.4	Sistema glutational.....	40

5.9.5	Análise do Dano Oxidativo (TBARS) .....	42
5.9.6	Dosagem de proteína carbonilada.....	42
5.10	Os ensaios Imunoenzimáticos do Parênquima Pulmonar .....	43
5.11	Análises estatísticas .....	44
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
6.1	Monitorização hemodinâmica .....	45
6.2	Avaliação da gasometria arterial e da função pulmonar .....	47
6.3	Análise do influxo de células no lavado broncoalveolar (LBA) .....	48
6.4	Biomarcadores do Estresse oxidativo .....	49
6.5	Análises Imunoenzimáticas.....	50
6.6	Estereologia .....	50
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>
<b>10</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>82</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A Ventilação Mecânica Invasiva (VMI) é uma ferramenta hospitalar de grande importância utilizada no tratamento de pacientes com insuficiência respiratória aguda ou crônica agudizada (Shy *et al.*, 2004; Powers *et al.*, 2013; Becker *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2019). Levando esses dados em consideração, o ajuste cuidadoso da oxigenação tecidual e dos parâmetros ventilatórios é de extrema necessidade, visto que uma regulação inadequada da fração inspirada de oxigênio ( $\text{FiO}_2$ ) pode ocasionar hipóxia ou hiperóxia e, conseqüentemente, gerar efeitos nocivos ao organismo, como alterações celulares e aumento do metabolismo anaeróbico (Barbosa, 2010; Baio, 2011; Lui *et al.*, 2018; Dekker *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). A VMI, por ser um recurso não fisiológico, desencadeia dano mecânico e também um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes presentes no tecido pulmonar, o que ocasiona uma desordem metabólica conhecida como estresse oxidativo (Whidden *et al.*, 2010; Gerard F. Curley, 2016), portanto, os marcadores do estresse oxidativo compõem instrumentos importantes na análise dos possíveis efeitos sobre os processos fisiopatológicos e inflamatórios no organismo (Barbosa, 2010; Baio, 2011).

Atualmente, apesar dos estudos relacionando o estresse oxidativo como consequência da VMI, os mecanismos envolvidos ainda necessitam ser elucidados pela literatura científica (Thannickal, 2003; Baio, 2011). O desequilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes é responsável por provocar um processo inflamatório capaz de agravar, por exemplo, uma lesão pulmonar pré-existente ou gerar algum tipo de pneumopatia (Whidden *et al.*, 2010; De Prost *et al.*, 2011; Boehme *et al.*, 2019). A VMI também pode ocasionar a lesão pulmonar induzida pelo ventilador (LPIV) que envolve mecanismos moleculares como liberação de citocinas pró-inflamatórias, produção de espécies reativas de oxigênio e ativação do sistema de complemento (Parinandi *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2018). Na tentativa de minimizar os efeitos antifisiológicos da VMI, existem algumas manobras que são conhecidas por suas ações protetoras no sistema respiratório, denominadas de manobras de recrutamento (MR), tais como suspiro, insuflação gradual e ventilação variável (Rocco *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2015; Constantin *et al.*, 2017). As MRs visam principalmente prevenir o agravamento de lesões pré-existentes ou o surgimento de novas lesões pulmonares (Ramirez, J.-M., 2014; Chiumello *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, o estudo ventilatório se estabeleceu como parte indispensável da medicina intensiva e as evoluções tecnológicas, assim como aumento de possibilidades de

manejos dos ventiladores mecânicos e de aparatos tecnológicos impõem a necessidade de mais estudos que avaliam a fisiopatologia e de ampliação dos conhecimentos clínicos para a prestação de atendimento de alto nível de qualidade (Masoumi *et al.*, 2017; Schonhofer, 2018). Nesse contexto, o presente estudo analisou os efeitos do suspiro sobre a resposta inflamatória pulmonar em ratos adultos saudáveis Wistar submetidos à VMI.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Anatomia e Fisiologia do Sistema Respiratório

O sistema respiratório apresenta algumas particularidades estruturais entre os pulmões de várias espécies, mas de maneira geral a parte mecânica dos pulmões dos mamíferos apresenta inúmeras semelhanças (Meban, 1985; Gomes *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2009; Sudy *et al.*, 2019), especificamente na parte neurológica do controle da respiração e na interação com os demais órgãos do indivíduo (Smith *et al.*, 2009; Ben-Tal e Tawhai, 2013).

O sistema respiratório é dividido funcionalmente em duas zonas; zona de condução (do nariz até o ducto alveolar) e a zona respiratória (do ducto alveolar até o alvéolo) que respectivamente servem para a condução do ar inalado e realização das trocas gasosas (Morris, 1988; Patwa e Shah, 2015b; a; Ball e Padalia, 2019). Já anatomicamente, o trato respiratório é dividido em vias: superior e inferior. A via aérea superior é constituída por nariz, faringe e laringe e a via aérea inferior é composta por traqueia, brônquios, bronquíolos, ductos alveolares e alvéolos (Adewale, 2009; Patwa e Shah, 2015a; Kubin, 2016).

As vias aéreas superiores têm influência na condução do ar para as vias aéreas inferiores, além de importante papel na fonação, digestão, umidificação e aquecimento do ar inspirado (Pohunek, 2004; Saran e Bordoni, 2019). Já as vias aéreas inferiores exercem função primordial na ventilação, difusão e perfusão. Após ocorrer a entrada de ar nos pulmões, é necessário que ocorram também as trocas gasosas, denominada de hematose, fenômeno em que os gases, oxigênio e gás carbônico, passam entre alvéolos e capilares pulmonares por difusão, através da membrana respiratória (Maina, 2002; Haitsma, 2007; Hsia *et al.*, 2016). Especificamente, o movimento do gás inspirado para dentro do pulmão e do gás exalado para fora do mesmo é chamado de ventilação e, os pulmões são inflados e desinflados devido à diferenças de pressão dentro do espaço intrapleural (Janssens *et al.*, 1999). Importante salientar também que a distensibilidade pulmonar promoverá a produção local de surfactante, uma substância cuja função será de reduzir a tensão superficial do líquido alveolar e melhorar as trocas gasosas (Wagner *et al.*, 1974; Goerke, 1998; Silva *et al.*, 2017).

Além das trocas gasosas foi relatado que a atividade respiratória também possui interferência de funções "não-ventilatórias" tais como o comportamento respiratório que é, por exemplo, altamente influenciado por estados emocionais que podem ser comportamentos negativos (pânico, ansiedade e dor) e ou emoções positivas (prazer, amor e alívio) (Ramirez,

J.-M., 2014; Vlemincx *et al.*, 2018). Tanto humanos quanto animais, necessitam adaptar constantemente a atividade respiratória para atender às necessidades homeostáticas e comportamentais, ou seja, se ajustar às mudanças internas e externas para garantir a sobrevivência (Milsom *et al.*, 2004; Dutschmann e Dick, 2012).

Neste contexto, a aplicação clínica dos conhecimentos anatômicos e fisiológicos do sistema respiratório serve para a condução segura em caso de necessidade de suporte ventilatório invasivo durante a anestesia, auxilia a aperfeiçoar as condições ventilatórias dos pacientes críticos e, ajuda no manejo adequado das doenças respiratórias (Patwa e Shah, 2015a; Cui *et al.*, 2019). A VMI, portanto, tem por finalidade, a manutenção das trocas gasosas (correção da hipoxemia e da acidose respiratória associada à hipercapnia), reverter ou evitar a fadiga da musculatura respiratória que, em situações agudas de alta demanda metabólica, está elevada, diminuir o consumo de oxigênio, dessa forma reduzindo o desconforto ventilatório (Schettino *et al.*, 2007; Smallwood e Davis, 2019). Em certas situações, seja de doença, de trauma ou mesmo intra-cirúrgico, em que o aporte de oxigênio não é fornecido de forma suficiente e, para não entrar em falência ventilatória, faz-se necessário a ventilação mecânica para garantir o ciclo ventilatório (Iqbal *et al.*, 2015; Kreppin *et al.*, 2016).

## **2.2 A Ventilação Mecânica**

Ao longo do tempo, a VMI evoluiu passando desde a criação do laringoscópio para a intubação endotraqueal (1895), da utilização do pulmão de aço (1876) para o desenvolvimento dos modernos ventiladores com diversas possibilidades de ajustes de parâmetros ventilatórios (Ramirez, J.-M., 2014; Slutsky, 2015). A VMI é aplicada em situações como choque séptico, problemas neurológicos, (Schettino *et al.*, 2007), síndrome de Rett (Weese-Mayer *et al.*, 2006; Weese-Mayer, Lieske, *et al.*, 2008; Ramirez, Ward, *et al.*, 2013), disautonomia familiar (Weese-Mayer, Kenny, *et al.*, 2008; Carroll *et al.*, 2012), síndrome de morte súbita infantil (Kinney *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2013; Paterson, 2013), síndrome congênita de hipoventilação central (Ramanantsoa N, 2018), apneia do sono (Ramirez, Garcia, *et al.*, 2013; Gozal D, 2018) e morte súbita e epilepsia (Kalume, 2013; Sowers *et al.*, 2013), portanto, o estudo das funções ventilatórias fisiológicas é de grande interesse clínico no tratamento de diversas doenças respiratórias.

Existem diversos modos ventilatórios, com diferentes parâmetros utilizados em cada um dele, mas, especificamente, há dois modos mais utilizados: ventilação controlada a pressão

(PCV) e ventilação controlada a volume (VCV) (Prella *et al.*, 2002; Koh, 2007; Sahetya *et al.*, 2017). Entretanto, independentemente do modo/parâmetro utilizado, a ventilação é considerada um recurso não fisiológico, uma vez que ocasiona alterações na mecânica pulmonar capazes de gerar variações nas pressões e forças elásticas existentes no tecido pulmonar através, por exemplo, da interferência na produção de surfactante (Veldhuizen *et al.*, 1998).

O surfactante é uma substância responsável por impedir o fechamento dos alvéolos, por meio da redução da tensão superficial existente entre os líquidos alveolares e o ar inspirado, dessa forma, uma redução da produção do surfactante pelos pneumócitos do tipo II (Figura 1), pode gerar desde uma redução da complacência pulmonar, que é a capacidade de expandir o pulmão ou o colapso pulmonar, denominado de atelectasia (Ketko e Donn, 2014; Silva *et al.*, 2017). Portanto, o desmame da VMI está associada à vários benefícios clínicos como por exemplo a diminuição do gasto energético dos músculos da ventilação, diminuição da sedação e possibilidade de mobilização precoce no leito hospitalar (Mcmullen Sarah M, 2012; Mauri *et al.*, 2013).

Entretanto, apesar de ser um recurso imprescindível, a VMI pode ocasionar alguns efeitos deletérios mesmo em pulmões sem pneumopatias (Slutsky e Ranieri, 2013; Gerard F. Curley, 2016) (Figura 1), tais como: atelectrauma (trauma relacionada com a distensão e colapso cíclico dos alvéolos), barotrauma (trauma pela pressão), volutrauma (trauma pelo volume) ou biotrauma (alterações inflamatórias pulmonares e sistêmicas decorrentes de repetidas lesões celulares) e, sobretudo, uma desordem metabólica através do estresse oxidativo (Whidden *et al.*, 2010; De Prost *et al.*, 2011). Estudos experimentais em animais têm demonstrado que o estresse oxidativo está relacionado ao extravasamento de proteínas, ocasionar um aumento na permeabilidade pulmonar e, conseqüentemente, aumento da migração de células inflamatórias e lesões endoteliais (Nagato *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011).

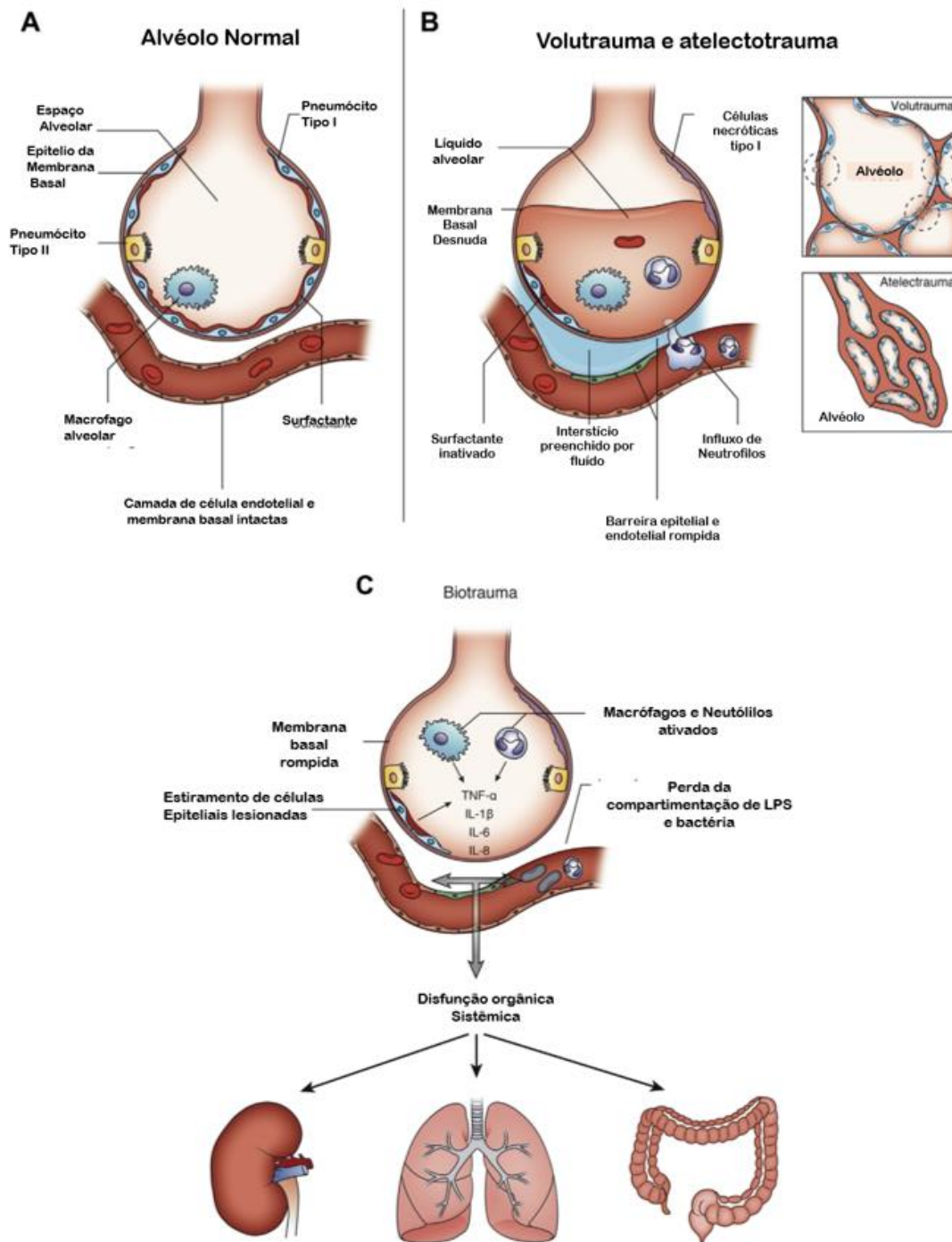


Figura 1. Alterações locais e sistêmicas causadas pela ventilação mecânica.

A figura é dividida em A, B e C, comparando um alvéolo normal e as alterações induzidas pelo ventilador de forma localizada no pulmão levando a disfunções sistêmicas. A: alvéolo normal. B: alvéolo lesionado por ventilação mecânica e com lesão endotelial e epitelial, volutrauma e atelectrauma. C: VMI promovendo aumento dos níveis de mediadores inflamatórios. Fonte: adaptado de Gerard (2016).

Além disso, estudos têm descrito lesões e disfunções diafragmáticas induzidas pelo ventilador (DDIV) mesmo com ventilações mecânicas de curta duração, desde a presença de processo inflamatório, estresse oxidativo, atividades proteolíticas e até mesmo atrofia muscular (Powers *et al.*, 2002; Deruisseau *et al.*, 2005; Mcclung *et al.*, 2008; Powers *et al.*, 2013). Tais lesões dificultam o desmame da ventilação e pesquisas têm mostrado que 18 a 24 horas de VMI já são suficientes para desenvolver lesões diafragmáticas induzidas pelo ventilador tanto em animais experimentais quanto em humanos (Levine *et al.*, 2008; Schepens *et al.*, 2015). Segundo Powers e colaboradores (2013) a quantidade de publicações referentes às miopatias diafragmáticas vem crescendo de forma exponencial demonstrando a importância da compreensão dos mecanismos da lesão no impacto direto na prática clínica e no desenvolvimento de estratégias ventilatórias protetoras (Figura 2)(Grosu *et al.*, 2012; Powers *et al.*, 2013).

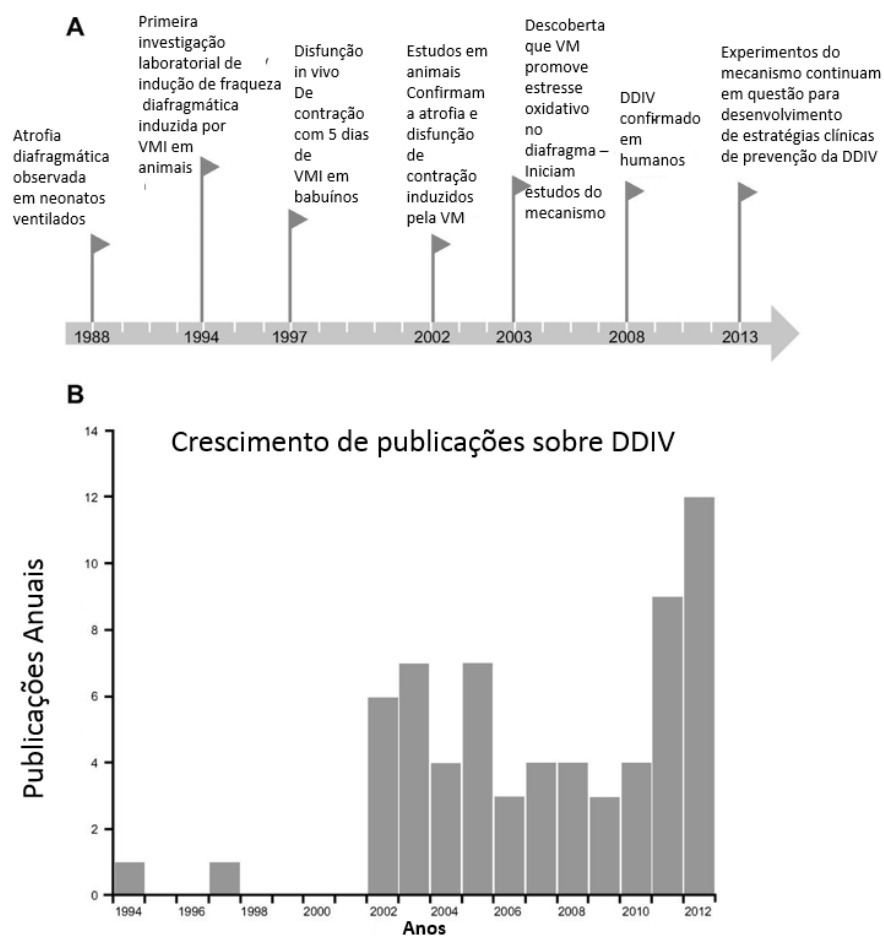


Figura 2. Crescente publicações sobre Disfunção diafragmática induzida pelo ventilador (DDIV)

A: ilustração histórica das pesquisas em disfunção diafragmática induzidas pelo ventilador. B: crescimento anual nas pesquisas relacionadas à DDIV. Fonte: Adaptado de Powers (2013).

Outro fato importante a ser destacado, é que podem surgir complicações locais decorrentes da própria prótese endotraqueal, quando ocorre a intubação, sendo elas: laceração das cordas vocais, laringoespasma, injúria faríngea com sangramento local, intubação seletiva e úlceras de mucosa em diferentes níveis das vias aéreas, a estenose sub-glótica pós-intubação prolongada e laringite pós-extubação (Hypes *et al.*, 2017; Mamede *et al.*, 2017; Volsko *et al.*, 2018). O ajuste de parâmetros ventilatórios devem ser dinâmicos e personalizados sendo alinhadas de acordo com as mudanças das condições clínicas, por exemplo: condições como obesidade, broncoespasmo, asma ou enfisema podem exigir pressões de ventilação superiores a 20 cmH<sub>2</sub>O valor que, poderiam induzir à oclusão de glote, pressurização do estômago, vômito e a aspiração em pacientes (Becker *et al.*, 2014).

Devemos relatar também as complicações relacionadas a traqueostomia e ao tubo endotraqueal precoces e tardias, tais como a retirada da cânula, por causa da movimentação do pescoço e má fixação, enfisema subcutâneo, sangramento de vaso tireoidiano, estenose traqueal, traqueomalácia, fístula traqueoesofágica, hemorragias e pneumotórax (Baid, 2016; Oliveira *et al.*, 2018). Outro fator determinante para as complicações da VMI é o gênero do paciente contribuindo, consideravelmente, no agravamento da patogênese de várias doenças pulmonares (Miller e Hunt, 1996; Verthelyi, 2001; Larcombe *et al.*, 2011), isso é afirmado, uma vez que dados epidemiológicos e experimentais sugerem que os hormônios sexuais podem ser importantes moduladores fisiológicos, pois exercem efeitos reguladores no desenvolvimento, na fisiologia e patologias pulmonares (Larcombe *et al.*, 2011; Jaillon *et al.*, 2019). Tornando-se necessário o reconhecimento do potencial das ações dos esteroides sexuais nessas doenças para um melhor planejamento de opções terapêuticas (Caracta, 2003; Card, Jeffrey W. *et al.*, 2006).

### **2.3 Lesão Pulmonar induzida pelo ventilador**

Dentro das complicações advindas da ventilação mecânica pode-se destacar também as lesões causadas pelo próprio ventilador denominadas de Lesão Pulmonar Induzida pelo Ventilador (LPVI) (Parker *et al.*, 1993; Rocco *et al.*, 2012; Tonetti *et al.*, 2017). A LPVI resulta de uma sucessão de eventos que se inicia com a alteração mecânica pulmonar e, posteriormente, as alterações inflamatórias e de estresse oxidativo que desencadeiam uma destruição estrutural



nos pulmões (Gillette e Hess, 2001; Rocco *et al.*, 2012). Segundo Sutherasan e colaboradores (2014) (Sutherasan, Yuda *et al.*, 2014) a prevenção seria a melhor forma de minimizar os efeitos deletérios e os principais mecanismos que levam a lesão são: o aumento do estresse e da tensão induzido pelo alto volume corrente, o aumento da tensão de cisalhamento, isto é a abertura e o fechamento cíclico provocados pela ventilação em unidades alveolares previamente atelectásicas, a distribuição da perfusão e o biotrauma.

Atualmente, existem diversas condutas que minimizam a lesão pulmonar induzida pelo ventilador tais como a posição prona, o bloqueio neuromuscular, níveis mais altos de pressão positiva expiratória final (PEEP), baixo volume corrente, acompanhamento dos biomarcadores, a utilização de técnicas extracorpóreas e pôr fim a utilização de pressões dirigidas (com o auxílio da medida da pressão esofageal), que podem ser observadas na Figura 3. Também de acordo com Sutherasan e colaboradores (2014), na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) moderado a grave, todas condutas anteriores descritas seriam de suma importância para minimizar a LPVI, todavia, exclusivamente nas primeiras 48 horas. A LPVI pode ocorrer tanto em pulmões com pneumopatias quanto em pulmões saudáveis (Sutherasan, Yuda *et al.*, 2014; Gattinoni *et al.*, 2016) e, as abordagens que minimizam a LPVI são aquelas marcadas por diminuir os índices de resposta inflamatória pulmonar e sistêmica (Gerard F. Curley, 2016).

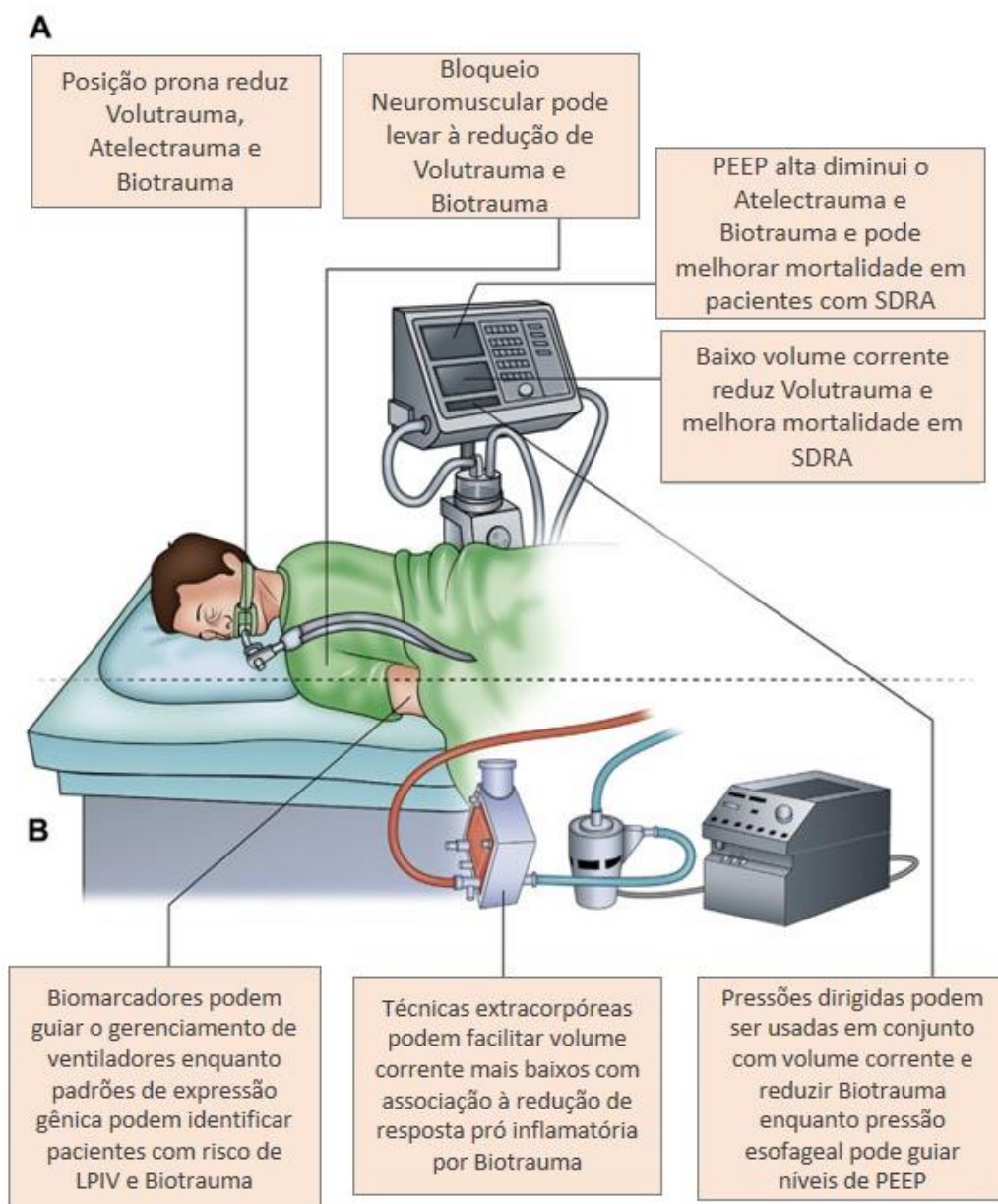


Figura 3. Atitudes preventivas para reduzir danos causados pela VMI.

Fonte: adaptado de Gerard e colaboradores (2016).

O colapso e distensão alveolares repetidos em áreas comprometidas do parênquima pulmonar são deletérios, pois criam forças de cisalhamento na parede alveolar e determinam o aumento na síntese e liberação local de mediadores inflamatórios, agravando a lesão alveolar e o processo inflamatório local (Mauri *et al.*, 2015). Dentre as muitas estratégias para adotar uma ventilação preventiva, o suspiro é de grande destaque para minimizar o potencial de lesão pulmonar associado ao uso de concentrações tóxicas de oxigênio e para evitar colapso pulmonar ao final da expiração, como também o controle da PEEP, em que o nível de pressão exercida

impedirá o colapsamento alveolar pós-intubação sendo importante recurso ventilatório empregado para adequar a relação ventilação/perfusão (V/Q) e, fisiologicamente, proteger as áreas de troca não comprometidas (Costa *et al.*, 2009; Mauri *et al.*, 2015; Andrade *et al.*, 2017).

## 2.4 Pressão Positiva Expiratória Final

O conhecimento quanto a utilização da PEEP é de fundamental importância, porque durante a VMI a PEEP é uma manobra de recrutamento alveolar que os especialistas utilizam com a finalidade de recrutar e estabilizar unidades pulmonares em casos de insuficiência respiratória que cursam com hipoxemia ou hipercapnia (Love *et al.*, 1995; Acosta *et al.*, 2007).

A utilização da PEEP próxima do fisiológico durante a ventilação artificial é comprovadamente associada à melhora das trocas gasosas com aumento de oxigenação (demonstrada pelo aumento da pressão parcial de oxigênio - PaO<sub>2</sub>) e diminuição da hipercapnia (demonstrada pela diminuição do valor de pressão parcial de gás carbônico - PaCO<sub>2</sub>) (Barbas *et al.*, 1998).

Em oposição a esses benefícios citados, a utilização da PEEP em níveis não fisiológicos pode levar à hiperdistensão alveolar, aumentando o risco da LPIV (Brochard, 2001). A VMI com presença de PEEP leva à aumento da pressão intratorácica que desencadeia alterações cardiopulmonares como redução do retorno venoso e débito cardíaco (Figura 4) (Mutlu *et al.*, 2001; Wiesen *et al.*, 2013; Grubler *et al.*, 2017).

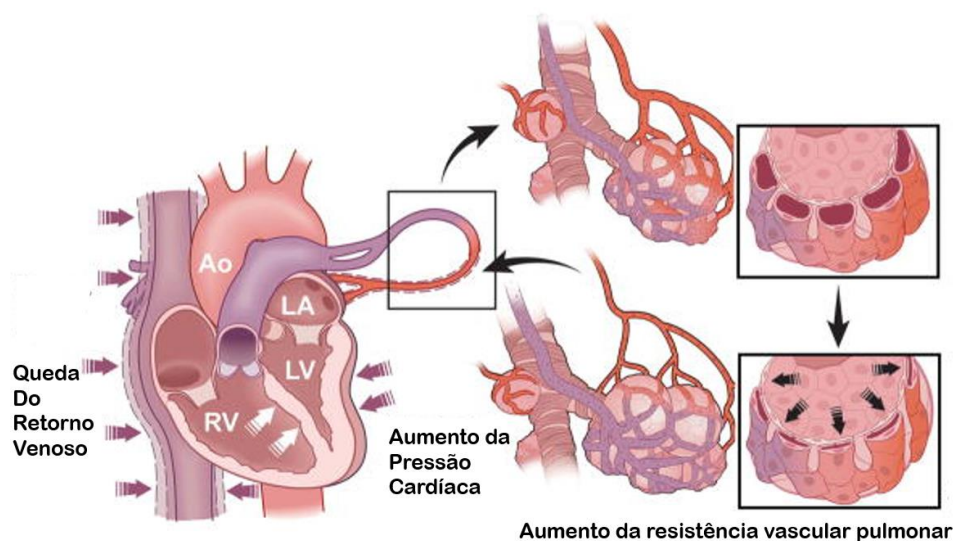


Figura 4. Efeitos mecânicos da ventilação com PEEP na circulação cardiopulmonar.

Fonte: adaptado de Wiesen e colaboradores (2013).

Ao indicar a ventilação mecânica em um paciente, os profissionais devem estar cientes de que isso afetará a fisiologia cardiopulmonar e poderá alterar o estado hemodinâmico, e embora possa corresponder à uma alteração mínima em uma pessoa saudável, os efeitos hemodinâmicos podem causar alterações em paciente gravemente enfermo (Lamia *et al.*, 2016; Grubler *et al.*, 2017; Hickey e Giwa, 2019).

De acordo com Wielsen e colaboradores (2013), a presença de pressão positiva na VM produz vários efeitos mecânicos e na circulação cardiopulmonar dos quais podemos destacar: a diminuição do retorno venoso (devido à pressão externa na veia cava inferior e a consequente diminuição do seu calibre), a dilatação do ventrículo direito (com desvio do septo como consequência da elevação da pós carga, o menor enchimento do ventrículo esquerdo e a diminuição do débito cardíaco (Wiesen *et al.*, 2013).

## 2.5 Suspiro

O suspiro, assim como a PEEP, também é uma manobra de recrutamento e quando utilizada na VMI tenta simular um reflexo natural durante a ventilação espontânea (Vlemincx *et al.*, 2017; Vlemincx *et al.*, 2018). O suspiro que ocorre naturalmente é um reflexo homeostático fisiológico e cíclico que mantém o correto funcionamento pulmonar e diminui a atelectasia (Lieske *et al.*, 2000), diminuindo também a heterogeneidade da ventilação pulmonar (Mauri *et al.*, 2015), promove uma ventilação aumentada e profunda com distintas propriedades neurobiológicas, fisiológicas e psicológicas que o distingue de uma respiração normal. Basicamente, o complexo pré-Bötzinger é essencial para gerar suspiros e respiração, sendo que as interações moduladoras e sinápticas ocorrem principalmente dentro desta rede local e entre redes localizadas no tronco cerebral, cerebelo, córtex, hipotálamo, amígdala e parte periaquedutal tendo inter-relação entre fisiologia, psicologia e patologia (Ramirez, J. M., 2014; Barnett *et al.*, 2017).

Em 1982, Richter demonstrou que o padrão respiratório não é apenas a alternância entre inspiração e expiração, mas é composto basicamente por 3 fases: inspiração, pós inspiração (ou expiração ativa - estágio 1) e expiração ativa (estágio 2 da expiração) (Richter, 1982), sendo que no mapeamento neuro-funcional respiratório (Figura 5) podemos destacar duas importantes regiões:

1. Complexo de Bötzing: composto por agrupamento de neurônios inibitórios predominantemente expiratório (Ezure, 1990; Schreihofe e Guyenet, 1997)

2. Complexo pre Bötzing: composto por agrupamento neuronal pela geração do ritmo inspiratório e do suspiro (Smith *et al.*, 1991; Rekling e Feldman, 1998; Feldman e Del Negro, 2006; Jones e Dutschmann, 2016; Cregg *et al.*, 2017).

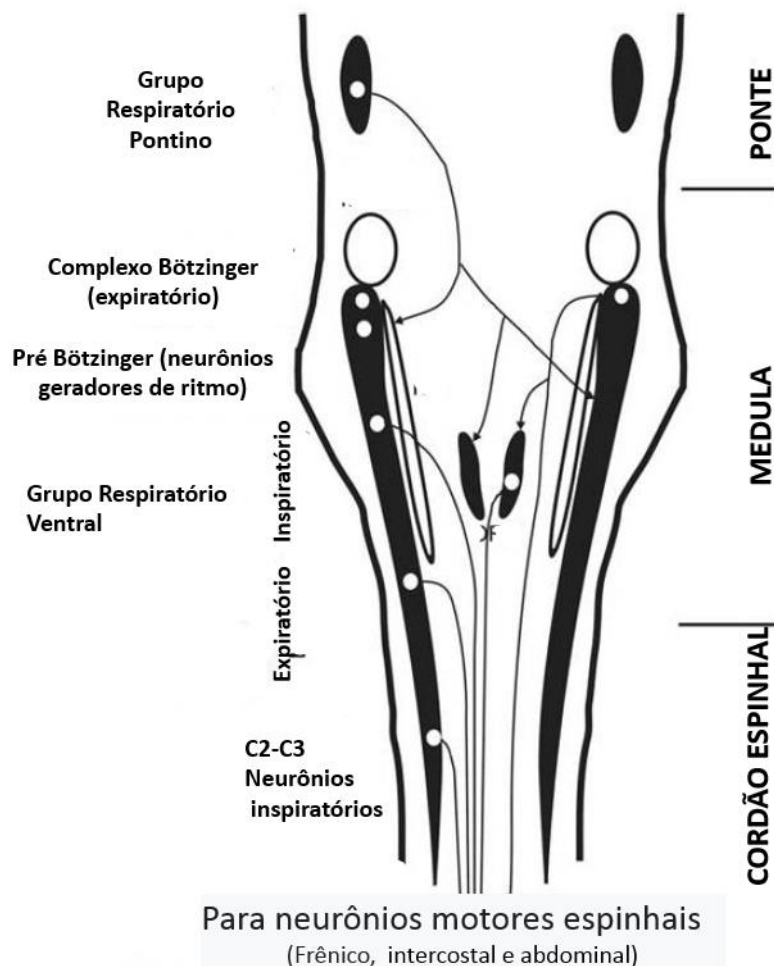


Figura 5. Anatomia do sistema nervoso central referente ao controle do centro respiratório: complexo de pré-Bötzing e Bötzing.

Fonte: adaptado de Kubin e colaboradores (2016).

Os suspiros têm funções ventilatórias importantes, pois conduzem a uma expansão submáxima dos pulmões, o que evita o colapso progressivo dos alvéolos (Bendixen *et al.*, 1964; Hess e Bigatello, 2002; Cammarota *et al.*, 2011; Koch *et al.*, 2013). Os suspiros também promovem a recuperação de uma obstrução das vias aéreas durante apneia obstrutiva do sono (Caro *et al.*, 1960; Ferris e Pollard, 1960) e mantêm a função pulmonar (Cherniack, 1981). De modo interessante Koch e colaboradores (2013) demonstraram que ratos geneticamente modificados que são incapazes de suspirar morrem de graves problemas pulmonares, sugerindo que os suspiros são essenciais para a sobrevivência animal (Koch *et al.*, 2013). De modo geral,

o suspiro é abolido por certas condições, como por exemplo, a anestesia geral (drogas bloqueadoras neuromusculares), devido a isso vários estudos comprovaram correlação entre atelectasias e complicações pós operatórias que elevam os custos para as unidades de saúde (Brismar *et al.*, 1985; Magnusson e Spahn, 2003; Hartland *et al.*, 2015).

O suspiro tem como principal objetivo melhorar as trocas gasosas através do recrutamento máximo de unidades alveolares, proporcionando uma ventilação mais homogênea do parênquima pulmonar (Pelosi, Bottino, *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2001). Outro benefício reportado sobre o recurso do suspiro é que ao ser realizado, ajuda a produzir surfactante e distribuí-lo uniformemente na superfície alveolar e nas vias aéreas distais de forma fisiológica (Gonçalves e Cicarelli, 2005).

Recentemente, Mauri e colaboradores (2015) demonstraram que pacientes enfermos ventilados mecanicamente associados ao suspiro, houve redução da tensão pulmonar sugerindo que esta manobra de recrutamento possa melhorar a proteção pulmonar regional em pacientes com insuficiência respiratória aguda (Mauri *et al.*, 2015). Os benefícios do suspiro também podem ser associados a prevenção da hipóxia durante sucção, prevenção de atelectasia, re-expansão de áreas atelectasiadas e aumento da complacência pulmonar, além de otimizar o recrutamento pulmonar, diminuir a heterogeneidade, diminuir o risco de lesão pulmonar, encurtar o desmame e melhorar os desfechos clínicos (Clapham *et al.*, 1995; Mauri *et al.*, 2018).

Recentemente, Tabuchi e colaboradores (2016), afirmaram que a eficácia clínica da VMI é única, mas a compreensão no meio científico dos mecanismos biológicos subjacentes e do seu impacto sobre a dinâmica alveolar ainda permanece em caráter especulativo e apresentaram diferentes padrões de ventilação alveolar assíncrona em animais com lesão pulmonar aguda (LPA) (Tabuchi *et al.*, 2016).

Neste mesmo estudo avaliaram mudanças na dinâmica alveolar de murinos e os efeitos sobre as trocas gasosas locais em modelos experimentais submetidos lesão pulmonar induzida e sua capacidade de resposta aos suspiros (Figura 6) e, demonstraram que os suspiros individuais foram capazes de restaurar em 100% a dinâmica alveolar bem como normalizar as trocas gasosas em situações de lesões pulmonares agudas, sugerindo que os suspiros seriam uma estratégia eficaz para restaurar a ventilação alveolar intacta (Tabuchi *et al.*, 2016). Apesar da relevância clínica e epidemiológica não há consenso da utilização e parâmetros do suspiro na prática clínica em pacientes submetidos a VMI, bem como ausência de estudos tanto em

animais quanto de humanos sem pneumopatias prévias que analisem o perfil inflamatório e fisiopatológico, justificando a execução deste estudo.

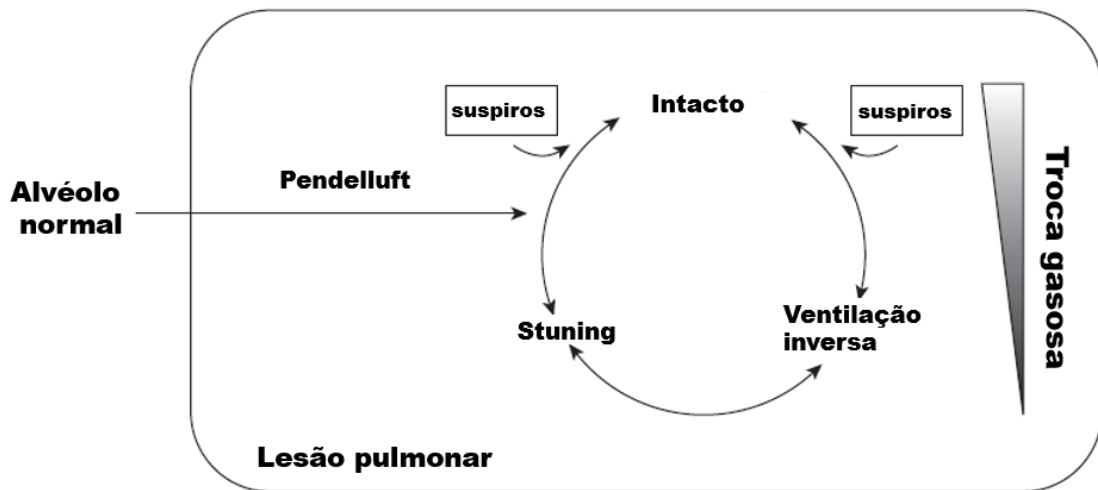


Figura 6. Ilustração esquemática da sequência da dinâmica alveolar e sua restauração pelo suspiro após lesão pulmonar aguda induzida, juntamente com a normatização das trocas gasosas.

Fonte adaptado de Tabuchi e colaboradores (2016).

### **3 JUSTIFICATIVA**

Tendo-se em vista o paradoxo entre a Ventilação Mecânica Invasiva (VMI), imprescindível, e entre os seus potenciais danos ao organismo tais como, barotrauma (trauma pela pressão), atelectrauma (lesão relacionada com a distensão e colapso constante e cíclico de unidades alveolares), volutrauma (trauma pelo volume), e o biotrauma (alterações inflamatórias pulmonares e sistêmicas decorrentes de repetidas lesões celulares induzidas pela VMI), o estudo dos efeitos do suspiro torna-se de extrema relevância, uma vez que o entendimento do possível efeito protetor dessa manobra de recrutamento alveolar vise evitar e minimizar os agravamentos locais e sistêmicos induzidos pela VMI.

Os mecanismos protetores do suspiro frente às consequências da VMI ainda são pouco elucidados. Acredita-se que o presente estudo experimental em ratos possa contribuir para um maior esclarecimento dos efeitos do suspiro, bem como para a elaboração de protocolos ventilatórios em humanos podendo gerar grande impacto econômico, uma vez que poderá acelerar o desmame ventilatório, diminuir tempo de internação e minimizar as lesões secundárias à VMI.



## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Analisar os efeitos do suspiro sobre a resposta inflamatória pulmonar e do estresse oxidativo em ratos adultos saudáveis Wistar submetidos à VMI.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Analisar e comparar o influxo de células inflamatórias para o parênquima pulmonar de animais em ventilação espontânea e os parênquimas dos animais ventilados artificialmente com e sem associação com a técnica do suspiro;
- Observar a atividade das enzimas antioxidantes no parênquima pulmonar em Ratos Wistar submetidos ou não à técnica do suspiro;
- Mensurar os níveis de biomarcadores do dano oxidativo e inflamatórios no parênquima pulmonar em Ratos Wistar submetidos ou não à técnica do suspiro;
- Analisar o padrão histológico do parênquima pulmonar em Ratos Wistar submetidos ou não à técnica do suspiro.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Animais**

Para execução deste projeto foram utilizados 31 Ratos Wistar, machos, obtidos do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), mantidos em sala de experimentação sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade. Todos os animais possuíam livre acesso à água e ração padrão (Nuvilab – que são rações utilizadas para a alimentação das colônias de camundongos, ratos e hamsters) e foram submetidos a condições ambientais de luminosidade controlada (alternando ciclo claro e escuro de 12 horas) e temperatura ambiente. Os procedimentos experimentais realizados obedeceram aos Princípios Éticos de Experimentação Animal estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA) da UFOP (n. 2018/13), que consta no Anexo deste trabalho.

### **5.2 Grupos experimentais**

Os ratos Wistar foram divididos em 4 grupos, com um n amostral de 6 a 9 animais em cada grupo, sendo os grupos assim caracterizados:

- Grupo ventilação espontânea, denominado grupo controle (GC), n=6
- Grupo ventilação mecânica (GVM), n= 9
- Grupo ventilação mecânica submetidos a 20 suspiros por hora (GVM20), n= 9
- Grupo ventilação mecânica submetidos a 40 suspiros por hora (GVM40), n= 9

No grupo GVM20 em que foram realizados 20 suspiros por hora o ventilador foi programado para realizar automaticamente 1 disparo de suspiro à cada 240 incursões respiratórias e para o grupo GVM40 o ventilador foi programado para realizar o disparo automático de 1 suspiro à cada 120 incursões respiratórias.

### **5.3 Ventilação espontânea**

O grupo controle foi mantido sob ventilação espontânea em ar ambiente, acondicionados em gaiola apropriada de polipropileno, posteriormente foram anestesiados e canulados através da artéria femoral para fins de realização da monitorização hemodinâmica e controle da estabilidade do animal durante todo o procedimento, além de fornecer acesso para

coleta de material para realização da gasometria arterial. Estes procedimentos serão descritos posteriormente em um tópico específico.

Para registro da função pulmonar, os animais deste grupo, em ventilação espontânea, foram previamente ambientalizados a uma caixa hermeticamente fechada para adaptação prévia. Após isso, os animais foram colocados individualmente nesta caixa e permaneceram cerca de 8 minutos para registro dos parâmetros ventilatórios (frequência respiratória, volume corrente e volume minuto) através de pletismografia de corpo total, sendo expostos a ar medicinal com volume conhecido 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.

## **5.4 Ventilação Mecânica**

### **5.4.1 Sedação, analgesia e bloqueio neuromuscular**

Os animais foram sedados por via intraperitoneal (i.p.) com Midazolam (5 mg/Kg) e com Fentanil (0,16 µg/Kg). Após a sedação foi realizado bloqueio neuromuscular por via intravenosa (i.v.) com Cloreto de Suxametônio (1 mL/Kg) e os animais foram submetidos ao suporte ventilatório. As agulhas utilizadas para os ratos foram as de calibre 22G e o local da administração i.p. foi o quadrante abdominal inferior direito do animal, sendo conferido de rotina que a agulha tinha o comprimento necessário para atravessar toda espessura da parede abdominal e penetrado sem lesão de alça intestinal, efetivamente, na cavidade abdominal (Card, J. W. *et al.*, 2006).

### **5.4.2 Suporte ventilatório**

Os grupos submetidos à VMI foram ventilados artificialmente através do ventilador mecânico *Inspira Advanced Safety Ventilator* (Harvard Apparatus, Massachusetts, EUA). Os grupos foram ventilados durante uma hora de acordo com os parâmetros ventilatórios listados a seguir: Volume corrente (VC): 7 mL/kg, Frequência respiratória (FR): 80 ciclos/min, PEEP: 3 cmH<sub>2</sub>O; FiO<sub>2</sub>: 21%, no modo controlado a volume (VCV). A análise da saturação periférica e da temperatura corporal foram realizadas durante todo o período sob ventilação (Andrade *et al.*, 2017). No grupo GVM20 em que foram realizados 20 suspiros por hora, o ventilador foi programado para realizar automaticamente 1 disparo de suspiro, com 1 vez o VC (7mL/kg) à

cada 240 incursões respiratórias e para o grupo GVM40 o ventilador foi programado para realizar o disparo automático de 1 suspiro a cada 120 incursões respiratórias.

## **5.5 Avaliações de parâmetros cardiovasculares e coleta de sangue**

### **5.5.1 Canulação da artéria femoral**

Para registro dos parâmetros cardiovasculares foi realizada uma pequena incisão na pele da região inguinal, para separar a musculatura para localização do feixe vaso-nervoso femoral. As cânulas foram introduzidas na artéria femoral e na veia cava inferior através da veia femoral, para administração de drogas. A seguir, as mesmas foram amarradas junto ao feixe com fio cirúrgico.

### **5.5.2 Registro direto da Pressão arterial média e frequência cardíaca**

A avaliação dos diferentes parâmetros cardiovasculares foi realizada através do registro direto da pressão arterial nos animais anestesiados, previamente canulados pela artéria femoral, acoplados ao sistema computadorizado de aquisição de dados (Powerlab 4/30). A Pressão arterial média (PAM) foi monitorada por um transdutor de pressão modelo Gould conectado a um amplificador (ML221 Bridge Amp). A pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) foram continuamente amostradas por um sistema de conversão analógico/digital de 16 bits (PowerLab 4/30) 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 a PAM, as características temporais e as alterações máximas dos parâmetros desejados. PAM e FC foram derivados em tempo real à partir de pulsos de PAP, utilizando o *software* Chart 5. Essas variáveis foram apresentadas simultaneamente em canais distintos no monitor e armazenadas no disco rígido do computador (Andrade *et al.*, 2017).

### **5.5.3 Coleta de sangue**

No final da VMI uma alíquota de sangue foi colhida da artéria femoral e então foi destinada para realização da gasometria. Para tal exame, foi realizada a coleta 1 mL de sangue arterial utilizando-se a seringa heparinizada (Monovette®, Sarstedt). A gasometria foi realizada

pelo gasômetro modelo PRIME<sup>+</sup>® VET (Nova Biomedical Corporation, Waltham, Mass). A gasometria é um exame que possibilita medida dos gases arteriais como (PaO<sub>2</sub> e PaCO<sub>2</sub>) e outros parâmetros gasométricos como Bicarbonato (HCO<sub>3</sub>), saturação de oxigênio, relação PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>.

## **5.6 Eutanásia**

Ao término da ventilação mecânica, os ratos tiveram o tórax aberto, seguido de incisão no terceiro espaço intercostal para eutanásia por exsanguinação (Murta *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2016).

## **5.7 Coleta do lavado broncoalveolar (LBA)**

Imediatamente após a eutanásia, foram realizados os procedimentos para a coleta do Lavado Broncoalveolar (LBA). Os ratos foram traqueostomizados com cateter (18G) acoplado a uma seringa de 1 mL e os pulmões perfundidos com solução salina (0,9% NaCl), esse procedimento foi realizado três vezes, totalizando um volume final de 2,5-3,0 mL de líquido coletado (lavado broncoalveolar). As amostras foram armazenadas em tubos de polipropileno e mantidas em gelo (4° C) até o término do experimento para evitar a lise celular (Pena *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2016; Campos *et al.*, 2017).

### **5.7.1 Contagem total e diferencial de células do LBA**

Para a avaliação das células presentes nas vias aéreas, o LBA foi centrifugado a 4°C na velocidade de 3000 rpm (Eppendorf 5415R; Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) por 10 min. O *pellet* que contém os leucócitos foi imediatamente ressuspenso em 0.1 mL de salina.

Os leucócitos obtidos após a centrifugação foram utilizados para realizar a contagem total e diferencial. Para isto, 20 µl da solução ressuspensa foram colocados em um tubo contendo 180 µl da solução de Turk e, em seguida, uma alíquota foi retirada e colocada em uma câmara de Neubauer para contagem total de leucócitos em microscópio óptico. Para a contagem diferencial de células do LBA as amostras foram centrifugadas em Cito-centrífuga (INBRAS equipamentos para saúde, SP, BR). Uma lâmina histológica e 50 µL de amostra foram colocadas foram coradas com o kit de coloração rápido (Renylab química e farmacêutica Ltda., Barbacena, MG, BR) através da imersão do material em três soluções distintas e utilizadas para realização da contagem diferencial de leucócitos em microscópio óptico com imersão em óleo,

com objetiva de 100x, protocolo adaptado de Campos *et al.* e Chirico *et al.* (Campos *et al.*, 2013; Chirico *et al.*, 2018).

## **5.8 Coleta dos pulmões**

### **5.8.1 Processamento tecidual**

Após a realização do LBA, o ventrículo direito foi perfundido com solução salina para remoção do sangue nos pulmões. Os pulmões foram removidos preservando-se a traqueia e os brônquios. 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, o material foi processado da seguinte forma: banho em água corrente por 30 min, banho em álcool a 70% e 90% por 30min cada etapa, 2 banhos em álcool a 100% por 30 min cada e inclusão em parafina. Após o processamento de rotina e inclusão em parafina, foram realizados cortes seriados a 4µm, que foram corados em hematoxilina-eosina (H&E) para análise esterológica (Pena *et al.*, 2016).

### **5.8.2 Análises Estereológicas do parênquima pulmonar**

As análises estereológicas do parênquima pulmonar foram realizadas nas lâminas coradas em H&E. As lâminas foram fotografadas no Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx) da UFOP utilizando o microscópio de luz Primo star equipado com a câmera digital AxioCam 105 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha) acoplado ao software de captura ZEN lite image utilizando a objetiva microscópica de 40x.

A análise de densidade de volume de septo alveolar ( $V_v$ ) foi realizada em um sistema teste composto por 16 pontos e uma área de teste conhecida onde a linha proibida foi tomada como limite, para evitar a superestimação do número de estruturas. O sistema teste foi acoplado ao monitor e foram analisados 20 campos aleatórios das lâminas fotografadas em aumento de 40x, para a obtenção de amostras pulmonares uniformes e proporcionais. O número de pontos ( $P_p$ ) que atingiram os septos alveolares ( $V_v$  [sa]) e os espaços alveolares ( $V_v$  [a]) foram avaliados de acordo com o número total de pontos do sistema teste ( $P_t$ ). O volume de referência foi estimado pela contagem de pontos utilizando o ponto de teste do sistema ( $P_t$ ). A área total de 1,94 mm<sup>2</sup> foi analisada para determinar a análise volumétrica dos septos alveolares ( $V_v$  [sa])

e os espaços alveolares (V<sub>v</sub> [a]) em seções coradas com H&E (Valença *et al.*, 2006; Valença *et al.*, 2007).

### 5.8.3 Homogenato pulmonar

Para o estudo das enzimas antioxidantes, dano oxidativo e marcadores inflamatórios 100mg do tecido foram colocadas em tubo de polipropileno com 1 mL de tampão fosfato (pH 7,8), e homogeneizado utilizando um homogeneizador de tecidos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13000rpm, o sobrenadante coletado e armazenado em freezer (-80°C) (Ramos *et al.*, 2018) (Campos *et al.*, 2017).

## 5.9 Biomarcadores do Estresse Oxidativo

### 5.9.1 Proteínas Totais

A dosagem de proteínas foi realizada nas amostras do homogenato tecidual pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O reagente de Bradford contém como principal componente o corante Coomassie brilhante azul, que em solução ácida se liga às proteínas da amostra, alterando sua absorvância de 465nm para 595nm. Para essa análise uma curva padrão foi reproduzida por meio de concentrações crescentes da proteína albumina, para isso, 10 mg de albumina foi dissolvida em 1000 µL de água Mili-Q. A partir dessa solução inicial, 200 µL foram adicionados em 3,8 mL de água Mili-Q, obtendo-se um total de 4 mL de solução na concentração de 0,5 mg/mL (Solução de estoque). Os pontos da curva variam de 0,5 mg/mL até 0,05 mg/mL, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Curva padrão de albumina.

Concentração da albumina	Solução de Estoque de Albumina	Água mili-Q
0,5 mg/mL	1000 µL	*
0,4 mg/mL	800 µL	200 µL
0,3 mg/mL	600 µL	400 µL
0,2 mg/mL	400 µL	600 µL
0,1 mg/mL	200 µL	800 µL
0,05 mg/mL	100 µL	900 µL

Para a solução de Comassie azul foi feita a diluição do reagente em água Mili-Q na concentração de 4:1. Feita a curva padrão e a diluição do corante, 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 4:1 foram pipetadas em todos os poços da placa. A placa permaneceu temperatura ambiente por 30 min e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas a 595nm (Campos *et al.*, 2017).

### 5.9.2 Atividade da superóxido Dismutase

A atividade de Superóxido Dismutase (SOD) foi mensurada no homogeneizado tecidual de acordo com o método descrito por Marklund (Marklund e Marklund, 1974). Este método é baseado na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. Os reagentes de trabalho utilizados foram: tampão fosfato (pH: 7,0), Pirogalol e 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 5.7.3. O sobrenadante foi pipetado em placa de 96 poços seguido a adição dos reagentes como descrito na Tabela 2.

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

	<b>Amostra - <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Tampão fosfato -<math>\mu\text{L}</math></b>	<b>MTT (1,25 mM)- <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Pirogalol (100 mM) - <math>\mu\text{L}</math></b>
<b>Branco</b>	*	144	6	*
<b>Padrão</b>	*	129	6	15
<b>Amostra</b>	30	99	6	15

As amostras foram incubadas por 5 minutos a 37°C, logo após 150  $\mu\text{L}$  de DMSO foram adicionados para parar a reação. Posteriormente, as absorbâncias foram obtidas em espectrofotômetro de placas à 570 nm. Após a leitura, o valor de absorbância foi convertido em unidade de SOD pela subtração do valor de absorbância da amostra pelo valor do branco, seguido pela divisão desse valor pelo encontrado na subtração do padrão pelo branco. O resultado foi expresso em U/mg de proteína (Campos *et al.*, 2017).

### 5.9.3 Atividade da Catalase

A atividade de Catalase (CAT) foi mensurada de acordo com o método descrito por (Aebi, 1984). O método se baseia na decomposição enzimática do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em um intervalo de 60



segundos por espectrofotometria (absorbância de 240 nm). Para a realização da análise foi utilizada uma alíquota do sobrenadante obtido em 5.7.3 como amostra biológica.

Inicialmente foram utilizados os seguintes reagentes para o preparo do tampão fosfato: 8,0086 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,0383 g de fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e 0,1496 g de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), os sais foram diluídos em água destilada e mantidos na geladeira (pH:7,2). No momento do ensaio foram utilizados 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 (970 µL) foi aliqotado juntamente com cada amostra (30 µL) em cubeta de quartzo e, registradas as leituras a 240nm durante 60 segundos, com anotação a cada 10 segundos. A atividade da catalase foi definida pela diminuição da absorbância a 240nm, de acordo com a Lei de Lambert Beer, onde 1 U equivale a 1µmol da decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto, por mL (Campos *et al.*, 2017).

#### 5.9.4 Sistema glutaciona

A dosagem de glutaciona foi adaptada do kit comercial Sigma #CS0260, que utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutaciona total (GSH + GSSG) em amostras biológicas através da redução do Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) à TNB. Para realizar essa análise, 50 mg de pulmão foi homogeneizada com 500 µL de ácido sulfosalicílico 5% (SSA), em seguida as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e usado como amostra biológica. A dosagem foi realizada em placa de 96 poços.

Primeiramente foi preparada a curva padrão da análise. Para isso 3 mg de glutaciona reduzida foram diluídas em 1 mL de água destilada e a partir da solução estoque foram preparados os pontos da curva, assim especificados na Tabela 3.

Tabela 3. Curva padrão para análise de glutaciona total.

<b>Ponto da curva</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Concentração de GSH (µM)</b>	50 µM	25 µM	12,5 µM	6,25 µM	3,125 µM
<b>Solução estoque de GSH (µL)</b>	50 µL	25 µL (Tubo 1)	25 µL (Tubo 2)	25 µL (Tubo 3)	25 µL (Tubo 4)
<b>SSA 5% (µL)</b>	-	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
<b>nmoles de GSH em 10 µL de amostra</b>	0,5	0,25	0,125	0,062	0,0312

Posteriormente, em cada poço da placa foram pipetados 10 µL de cada solução da curva, 10 µL das amostras para o teste ou 10 µL de SSA 5% para o branco, como descrito na Tabela 4. Em seguida foi adicionada à mistura de trabalho que continha tampão fosfato de potássio, glutathione redutase e DTNB. As amostras foram incubadas por 5 minutos e em seguida a reação foi iniciada com a adição de 50 µl de solução de NADPH. Com o início da reação, a absorbância foi imediatamente medida a 405 nm utilizando leitor de placa de ELISA (Biotek Elx808). Foram realizadas 5 leituras com intervalo de 1 minuto entre cada leitura.

Tabela 4: Reagentes para a análise de Glutathione

	<b>Amostra (µl)</b>	<b>SSA 5% (µl)</b>	<b>Mistura de trabalho (µl)</b>	<b>NADPH (µl) de uso</b>
<b>Branco</b>	-	10	150	50
<b>Curva Padrão (5 pontos)</b>	10 µl	-	150	50
<b>Amostra</b>	10 µl	-	150	50

Para mensurar os níveis de glutathione oxidada, a curva padrão e os reagentes foram pipetados na placa de 96 poços como descrito anteriormente, porém as amostras biológicas passaram por um processo de derivatização antes do início da dosagem. Para isso, foram feitas alíquotas de 100 µL de amostras e acrescentou-se a estas 2 µL de vinilpiridina e 5 µL de trietanolamina (TEA), com pH entre 6 e 7, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por uma hora. Após este período, utilizou-se 10 µl desta nova amostra para reagir com a mistura de trabalho, como anteriormente descrito.

As concentrações de glutathione total e oxidada foram obtidas através da curva padrão preparada em cada dosagem. Para encontrar a concentração de glutathione reduzida nas amostras foi subtraído o valor de glutathione oxidada do valor de concentração da glutathione total. Obteve-se a relação GSH/GSSG através da divisão dos resultados de concentração de GSH pelos resultados de GSSG (Murta *et al.*, 2016; Bandeira *et al.*, 2017).

### 5.9.5 Análise do Dano Oxidativo (TBARS)

A análise de peroxidação lipídica foi realizada de acordo com método descrito por (Buege, 1978). O ácido tiobarbitúrico (TBA) reage com produtos de oxidação de lipídios tais como o malondialdeído. Para a realização da análise, 500 µL do homogeneizado tecidual (obtido em 5.7.3), 250 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA 28% p/v dissolvido em ácido clorídrico), 250 µL de TBA 1% dissolvido em ácido acético 1:1 e 125 µL de butil hidróxitolueno (BHT) 5 Mm dissolvido em etanol foram misturados. 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 utilizado para leitura 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 (Soares *et al.*, 2016; De Souza *et al.*, 2018).

### 5.9.6 Dosagem de proteína carbonilada

A oxidação de proteínas pelas espécies reativas de oxigênio leva a formação de derivados carbonílicos. Esses podem ser mensurados por métodos que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH reage com grupos carbonílicos e gera a hidrazona correspondente, que pode ser analisada espectrofotometricamente.

Para a análise de carbonilação protéica foi utilizado o método descrito por Reznick e Packer, 1994, com adaptações. Para tal, 500 µL do homogeneizado pulmonar foram colocados em tubos de polipropileno e adicionados 500 µL de TCA 10%, após agitação no vórtex as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 500 µL 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 foram acrescentados 500 µL 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. As absorbâncias dos sobrenadantes foram determinadas em

espectrofotômetro (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) a 370 nm. A concentração de proteína carbonilada nas amostras foi determinada de acordo com a equação de Lambert Beer descrita abaixo:

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

- Abs = Absorbância
- $\varepsilon$  = 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, 1976).

Equação: Proteína carbonilada (nmol/mL) /Proteína total (mg/mL)

### 5.10 Os ensaios Imunoenzimáticos do Parênquima Pulmonar

As análises de interleucina - 1 (IL-1), interleucina - 6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos 1 (CCL2), proteína inflamatória de macrófago 1-alfa (CCL3), CCL5 (do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), fator de necrose tumoral (TNF), 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 -20°C e, posteriormente, utilizadas para análises por meio do método Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay (ELISA). Esses ensaios foram realizados utilizando kits (PeproTech, São Paulo, Brasil) 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  $\mu\text{L}$  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 Tween20) e as placas foram bloqueadas com 100  $\mu\text{L}$ /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 µL para cada poço e, a seguir, foi realizada incubação por 2 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários (anticorpo de detecção), após os poços serem devidamente lavados, foram diluídos em PBS-BSA 0,1% e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada e 100 µL de estreptoavidina ligada à peroxidase (na diluição recomendada pelo protocolo de cada kit) em PBS-BSA 0.1% foram adicionados à placa e a mesma incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. O cromógeno escolhido para revelação foi a Tetrametilbenzidina (Color Reagent B - R&D Systems, Minneapolis, USA). 5 mL do cromógeno foi adicionado a 5 mL de peróxido de hidrogênio adquirida pelo mesmo fabricante (Color reagent A - R&D Systems, Minneapolis, USA). 100 µL dessa solução foram adicionados em cada um dos poços e após vinte minutos de incubação em ausência de luz e temperatura ambiente, a reação foi bloqueada adicionando-se 100 µL de ácido sulfúrico (H<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 das quimiocinas e interleucinas presentes nas amostras foi determinada baseada na densidade óptica obtida com a curva padrão dos peptídeos, analisadas pelo software SOFT Max PRO 4.0. (Penitente *et al.*, 2015).

### 5.11 Análises estatísticas

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

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Monitorização hemodinâmica**

Os dados hemodinâmicos do grupo controle e dos grupos submetidos à ventilação mecânica que foram anotados no início e no final do experimento e dispostos na Tabela 5. Durante todo o experimento foram avaliados a Frequência Cardíaca e a Pressão arterial média e em relação aos dados hemodinâmicos coletados observou-se que não houve diferença estatística significativa nos parâmetros analisados em todos os grupos analisados desde o início e até o final do experimento.

Tabela 5. Hemodinâmica dos animais submetidos a ventilação mecânica

	<b>GC Inicial</b>	<b>GC Final</b>	<b>p</b>	<b>GVM Inicial</b>	<b>GVM Final</b>	<b>p</b>	<b>GVM20 Inicial</b>	<b>GVM20 Final</b>	<b>p</b>	<b>GVM40 Inicial</b>	<b>GVM40 Final</b>	<b>p</b>
<b>FC (bpm)</b>	441,4±23,5	441,0±16,4	>0,05	421,5±16,1	415,8±17,04	>0,05	394,5±19,1	414,6±13,3	>0,05	424,0±9,04	433,3±7,03	>0,05
<b>PAM (mmHg)</b>	125,8 ± 3,6	126,7 ± 2,3	>0,05	116,0 ± 4,7	117,6 ± 6,2	>0,05	124,5 ± 9,1	131,6 ± 5,8	>0,05	123,4 ± 8,2	132,9 ± 3,1	>0,05

GC: grupo controle; GVM: grupo ventilação mecânica; GVM20: grupo ventilação mecânica + 20 suspiros/h; GVM40: grupo ventilação mecânica + 40 suspiros/h; FC: frequência cardíaca, PAM: pressão arterial média. Os dados estão expressos em média ± erro padrão da média. Análise de Variância One Way ANOVA seguido do pós teste de Tukey (p<0.05), n= 6 a 9 animais por grupo

## 6.2 Avaliação da gasometria arterial e da função pulmonar

Ao término do protocolo experimental foram realizadas a gasometria arterial para analisar dos gases séricos e durante o protocolo análise dos parâmetros respiratórios tais como frequência respiratória, volume corrente e volume minuto, nos grupos experimentais. Os valores foram apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Gasometria arterial e função pulmonar dos animais submetidos a ventilação mecânica.

	GC	GVM	GVM20	GVM40
<b>Ph</b>	7,38 ± 0,009	7,39 ± 0,009	7,37 ± 0,008	7,39 ± 0,008
<b>SO<sub>2</sub> (%)</b>	95,75 ± 0,61	94,44 ± 0,92	93,38 ± 1,23	94,50 ± 0,92
<b>pO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	82,17 ± 4,15	99,20 ± 3,89 <sup>a</sup>	95,73 ± 2,63	100,2 ± 3,62 <sup>a</sup>
<b>pCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	35,37 ± 2,31	31,95 ± 1,29	30,20 ± 1,25	28,68 ± 0,80 <sup>a</sup>
<b>HCO<sub>3</sub> (mmol/L)</b>	21,65 ± 1,55	19,38 ± 0,55	18,10 ± 0,59 <sup>a</sup>	18,29 ± 0,71
<b>pO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub></b>	393,2 ± 19,87	474,4 ± 18,70 <sup>a</sup>	458,0 ± 12,61	479,2 ± 17,31 <sup>a</sup>
<b>FR (irpm)</b>	99,80 ± 6,16	80 ± 0,0 <sup>a</sup>	80 ± 0,0 <sup>a</sup>	80 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>VC (mL)</b>	2,89 ± 0,26	2,68 ± 0,07	2,60 ± 0,08	2,72 ± 0,05
<b>VM (mL/min)</b>	246,7 ± 13,39	214,6 ± 5,99	277,3 ± 9,14 <sup>b</sup>	363,2 ± 7,18 <sup>a,b,c</sup>

GC: grupo controle; GVM: grupo ventilação mecânica; GVM20: grupo ventilação mecânica + 20 suspiros/h; GVM40: grupo ventilação mecânica + 40 suspiros/h; SO<sub>2</sub>: saturação de oxigênio; pO<sub>2</sub>: pressão parcial de oxigênio; pCO<sub>2</sub>: pressão parcial de dióxido de carbono; HCO<sub>3</sub>: bicarbonato; FiO<sub>2</sub>: fração inspirada de oxigênio; FR: frequência respiratória; irpm: incursões respiratórias por minuto; VC: volume corrente; VM: volume minuto. (a) representa diferença significativa em relação ao GC, (b) representa diferença significativa em relação ao GVM, (c) representa diferença significativa em relação ao VM20. Os dados estão expressos em média ± erro padrão da média. Análise de Variância One Way ANOVA seguido do pós teste de Tukey (p<0.05), n= 6 a 9 animais por grupo.

Na análise gasométrica nota-se que a pO<sub>2</sub> do GVM e do GVM40 foi superior em relação ao GC. Esse mesmo resultado é percebido na relação pO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, já que a FiO<sub>2</sub> era uma variável fixa no experimento (21%). Na avaliação do bicarbonato, no GVM20 foi menor em relação ao GC. Em relação ao pCO<sub>2</sub> houve diminuição dessa variável em GVM40 em relação ao GC.



Percebe-se que as variações de bicarbonato foram compensadas pela variação do PCO<sub>2</sub> indicando que não houve repercussão metabólica.

### 6.3 Análise do influxo de células no lavado broncoalveolar (LBA)

Em cada grupo experimental a presença de células inflamatórias foi avaliada através da contagem total e diferencial de células no LBA (Tabela 7). Os resultados encontrados demonstraram que houve aumento do número leucócitos totais no LBA em todos os grupos em ventilação mecânica comparados ao GC. Ao realizar a avaliação das contagens diferenciais de leucócitos: macrófagos, linfócitos e neutrófilos, foi observado que houve maior recrutamento de neutrófilos para o LBA no GVM comparado ao GC, e de modo interessante houve diminuição do influxo em GVM40 em comparação ao GVM.

Tabela 7. Efeitos da ventilação mecânica sobre o recrutamento do número de células para o lavado broncoalveolar.

	GC	GVM	GVM20	GVM40
<b>Leucócitos (x10<sup>5</sup>/mL)</b>	13,75 ± 1,34	20,94 ± 1,51 <sup>a</sup>	15,54 ± 1,61	16,00 ± 1,42
<b>Macrófagos (x10<sup>5</sup>/mL)</b>	13,18 ± 1,25	17,41 ± 1,11	14,07 ± 1,46	15,04 ± 1,39
<b>Linfócitos (x10<sup>5</sup>/mL)</b>	0,32 ± 0,07	0,47 ± 0,12	0,28 ± 0,09	0,24 ± 0,09
<b>Neutrófilos (x10<sup>5</sup>/mL)</b>	0,15 (0,0; 0,72)	2,46 (2,11; 5,22) <sup>a</sup>	0,87 (0,61; 2,52)	0,76 (0,34; 0,99) <sup>b</sup>

GC: grupo controle; GVM: grupo ventilação mecânica; GVM20: grupo ventilação mecânica + 20 suspiros/h; GVM40: grupo ventilação mecânica + 40 suspiros/h. (a) representa diferença significativa em relação ao GC (b) representa diferença significativa em relação ao GVM. Os dados estão expressos em média ± erro padrão da média e em mediana (valor mínimo e valor máximo). Análise de Variância One Way ANOVA seguido do pós teste de Tukey, para a análise de neutrófilos foi utilizado o teste Kurskal Wallis seguido do pós teste de Dunn's (p<0.05), n= 6 a 9 animais por grupo.

#### 6.4 Biomarcadores do Estresse oxidativo

Os biomarcadores do estresse oxidativo (Tabela 8) no parênquima pulmonar foram avaliados através da atividade das enzimas SOD e CAT. Observa-se que essas enzimas tiveram suas atividades aumentadas no GVM em relação ao GC e, nos grupos GVM20 e GVM40, a atividade foi menor comparado à GVM. Em relação a razão de GSH/GSSG não houve variação significativa entre os grupos estudados. Quanto à formação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), os resultados mostraram que a peroxidação lipídica foi maior nos 3 grupos submetidos à ventilação mecânica (GVM, GVM20 e GVM40) quando comparados ao GC, porém ao adicionarmos o suspiro houve uma melhora parcial deste parâmetro sendo observado menor dano em GVM20 e GVM40 quando comparados ao GVM. Além disso, foi observada uma menor oxidação de proteínas no grupo GVM40 comparado ao GVM.

Tabela 8. Biomarcadores do estresse oxidativo no parênquima pulmonar dos animais submetidos a ventilação mecânica.

	GC	GVM	GVM20	GVM40
<b>SOD (U/mg PTN)</b>	15,66 ± 2,59	30,04 ± 1,70 <sup>a</sup>	19,34 ± 1,47 <sup>b</sup>	16,42 ± 3,36 <sup>b</sup>
<b>CAT (U/mg PTN)</b>	1,27 ± 0,19	2,27 ± 0,31 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,17 <sup>b</sup>
<b>GSH/GSSG</b>	0,77 (0,60; 0,95)	0,75 (0,64; 0,92)	0,88 (0,80; 0,90)	0,88 (0,82; 1,13)
<b>TBARS (nmol/mg PTN)</b>	0,54 ± 0,06	1,69 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,14 <sup>a,b</sup>	1,17 ± 0,18 <sup>a,b</sup>
<b>PTN carbonilada (nmol/mg PTN)</b>	9,13 ± 1,24	16,70 ± 2,71	13,76 ± 2,25	8,42 ± 1,44 <sup>b</sup>

GC: grupo controle; GVM: ventilação mecânica; GVM20: grupo ventilação mecânica + 20 suspiros/h; GVM40: grupo ventilação mecânica + 40 suspiros/h; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. (a) representa diferença significativa em relação ao GC (b) representa diferença significativa em relação ao GVM. Os dados estão expressos em média ± erro padrão da média. Análise de Variância One Way ANOVA seguido do pós teste de Tukey (p<0.05), n= 6 a 9 animais por grupo.

## 6.5 Análises Imunoenzimáticas

A análise dos níveis de biomarcadores inflamatórios CCL2, CCL3, CCL5, e IL-1, IL-6 e TNF foram realizados no homogeneizado pulmonar e demonstrados na Tabela 9. Em relação aos marcadores inflamatórios CCL2, CCL3 não houve diferença entre os níveis nos 4 grupos analisados. Já com relação a CCL5 observou-se aumento nos níveis no GVM40 em relação à GC. Quanto à IL-1, IL-6 e TNF observou-se um aumento em GVM comparado ao GC e o suspiro foi capaz de promover redução nos níveis destas citocinas pró-inflamatórias, ou seja, houve diminuição em GVM20 e GVM40 quando comparado à GVM.

Tabela 9. Marcadores inflamatórios no parênquima pulmonar dos animais submetidos a ventilação mecânica

	GC	GVM	VM20	VM40
<b>CCL2 (pg/mL)</b>	1522,9± 38,2	1520,6 ± 63,4	1554,8 ± 79,6	1482,1 ± 40,4
<b>CCL3 (pg/mL)</b>	173,4 ± 13,7	185,4 ± 14,3	157,6 ± 9,6	157,7 ± 8,5
<b>CCL5 (pg/mL)</b>	744,4 ± 80,2	895,2 ± 64,5	1028,6 ± 74,2	1086,5 ± 88,1 <sup>a</sup>
<b>IL-1 (pg/mL)</b>	861,8 ± 126,6	1178,3 ± 36,2 <sup>a</sup>	741,7 ± 41,5 <sup>b</sup>	733,4 ± 52,1 <sup>b</sup>
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	1317,4 ± 41,8	1605,9 ± 56,1 <sup>a</sup>	1344,8 ± 26,6 <sup>b</sup>	1337,4 ± 30,7 <sup>b</sup>
<b>TNF (pg/mL)</b>	1185,1 ± 27,3	1478,7 ± 41,9 <sup>a</sup>	1185,1 ± 40,1 <sup>b</sup>	1202,4 ± 21,5 <sup>b</sup>

GC: grupo controle; GVM: ventilação mecânica; GVM20: grupo ventilação mecânica + 20 suspiros/h; GVM40: grupo ventilação mecânica + 40 suspiros/h; CCL2 ou MCP1: proteína quimiotática de monócitos 1; CCL3 ou MIP-1 $\alpha$ : proteína inflamatória de macrófago 1-alfa; CCL5: RANTES; IL-1: interleucina 1; IL-6: interleucina 6; TNF: fator de necrose tumoral. (a) representa diferença significativa em relação ao GC (b) representa diferença significativa em relação ao GVM. Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Análise de Variância One Way ANOVA seguido do pós teste de Tukey ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$  a 9 animais por grupo.

## 6.6 Estereologia

Por último, foram feitas análises estereológicas do parênquima pulmonar dos grupos experimentais e não foram encontradas diferenças entre os grupos avaliados tanto para a densidade de volume de espaço aéreo alveolar quanto para a densidade de volume de septos alveolares, conforme demonstrado na Figura 7.

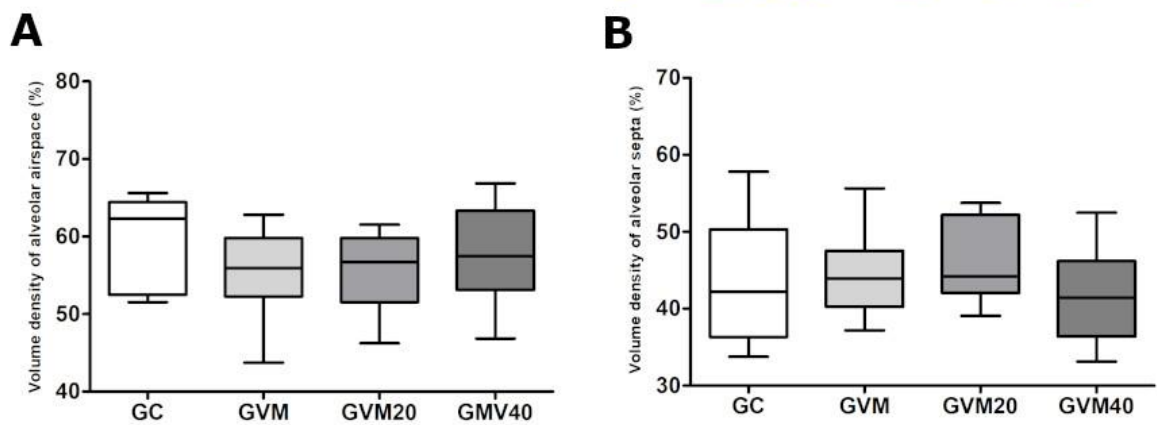
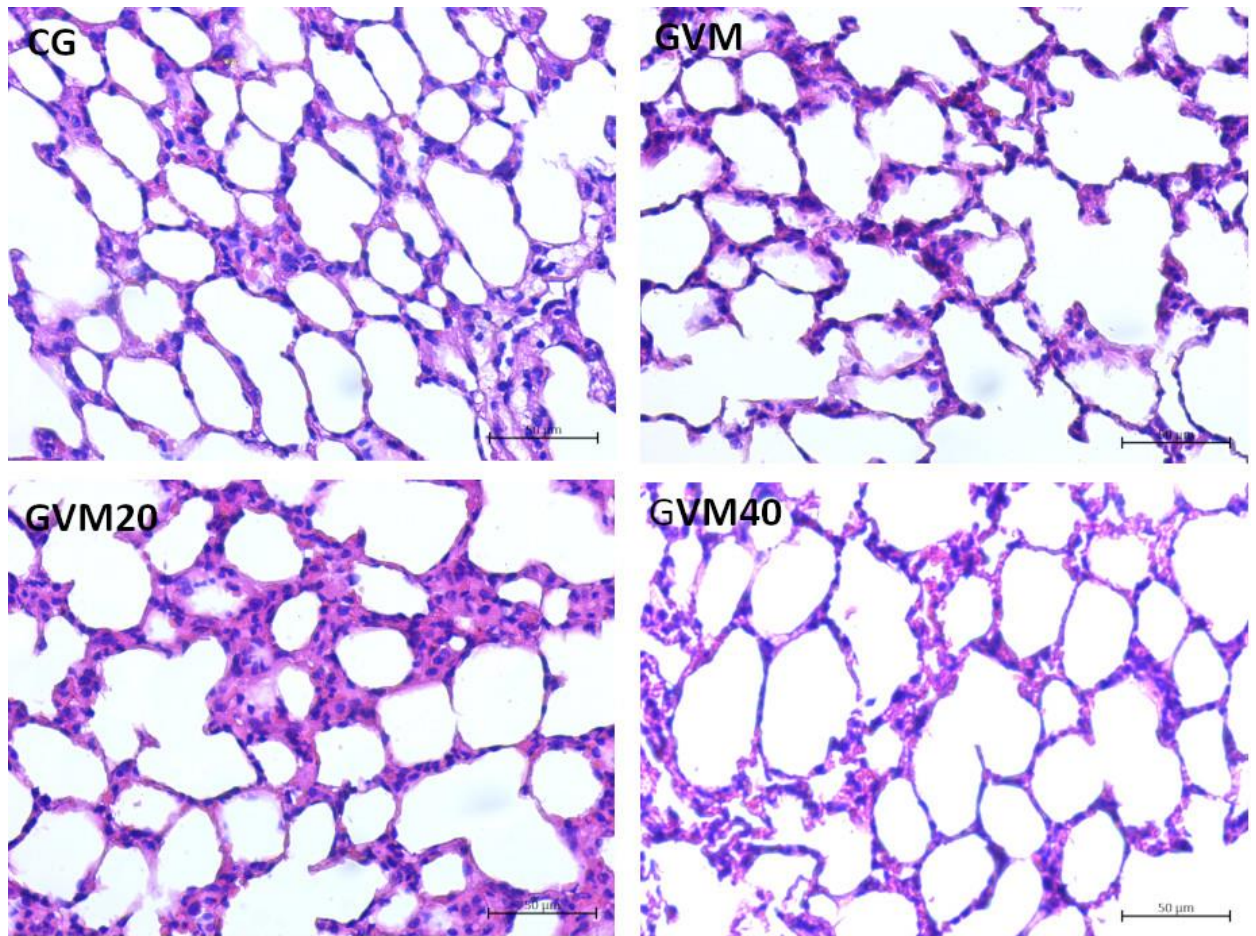


Figura 7. Análise estereológica das seções de pulmão e fotomicrografias de cortes do pulmão corado em H&E.

Aumento de 40x. Análise de área alveolar. Análise estereológica das seções de pulmão. (A) Densidade de volume de espaço aéreo alveolar (B) Densidade de volume de septo alveolar para A e B os dados estão expressos em mediana, valor mínimo e valor máximo. Análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$  a  $9$  animais por grupo. (C) Fotomicrografia representativa de pulmão coradas com HE. Barra =  $50\mu\text{m}$ , magnificação de  $400\times$ .

## 7 DISCUSSÃO

Neste estudo experimental, avaliamos o efeito da ventilação mecânica com e sem o uso do suspiro sob a resposta inflamatória nas vias aéreas e em pulmões saudáveis de ratos Wistar machos. Apesar de a ventilação mecânica ser indispensável em caso de falha ventilatória, já é descrito na literatura que ela pode induzir a alterações hemodinâmicas, danos teciduais, podendo levar à mortalidade e morbidade (Chowdhury *et al.*, 2012; Keszler, 2017). No presente estudo, não foram encontradas alterações hemodinâmicas nos grupos submetidos à VMI quando comparados ao grupo controle. A ausência de alterações hemodinâmicas nos grupos submetidos à ventilação mecânica e ao suspiro pode ser explicada pelos parâmetros ventilatórios utilizados neste trabalho serem próximos aos parâmetros fisiológicos dos roedores: frequência respiratória de 80 irpm, PEEP de 3cmH<sub>2</sub>O e VC de 7mL/Kg, como também serem ventilados por um período considerado breve, 1 hora. Em um estudo com ratos adultos Sprague-Dawley, mantidos sem VMI de 18 a 24 horas, percebeu-se instabilidade hemodinâmica com presença de hipoxemia, hipercapnia e leve acidose, durante o período experimental quando comparado com os animais em ventilação espontânea. Os autores atribuíram esses distúrbios na homeostase de gases sanguíneos à hipoventilação já que o drive respiratório estava deprimido (Powers *et al.*, 2002). Recentemente, um estudo realizado em coelhos com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) submetidos à VM, foram observadas alterações hemodinâmica sistêmica e na perfusão cerebral (Lovisari *et al.*, 2019). Porém neste estudo foram utilizados parâmetros não fisiológicos (VC: 6mL/Kg, PEEP: 6 cmH<sub>2</sub>O em pulmões não lesionados e, para coelhos com SDRA PEEP: 9 cmH<sub>2</sub>O associado à FiO<sub>2</sub>: 40%), de forma que mesmo em pulmões saudáveis percebeu-se redução da oxigenação cerebral e queda da PAM e FC.

No presente estudo não foram observadas alterações hemodinâmicas no início e no final do experimento entre os grupos analisados, o que demonstra que o suspiro não interferiu nos parâmetros hemodinâmicos e não acarretou efeitos no débito cardíaco, como é observado, por exemplo, em casos de valores elevados de PEEP (Viquerat *et al.*, 1983). A PEEP em níveis não fisiológico pode desencadear alterações como hiperdistensão alveolar, aumento de pressão intratorácica, mudanças na dinâmica cardiopulmonar e redução do débito cardíaco (Scharf *et al.*, 1980). Na análise hemodinâmica, o suspiro independente da frequência em que foi realizado (20 suspiros/hora ou 40 suspiros/hora) mostrou-se neutro.

Atualmente há uma tendência do uso de estratégias ventilatórias com menores volumes correntes para limitar a pressão de distensão alveolar e valor individualizado de PEEP para prevenir o colapso alveolar (Bendixen *et al.*, 1963; Coimbra e Silverio, 2001; Sahetya e Brower, 2017). Em um estudo em humanos, Gattinoni e colaboradores (1995) analisaram pacientes sedados com SDRA em que foram utilizados diferentes valores de PEEP (0, 5, 10, 15 e 20 cmH<sub>2</sub>O) e valor de volume corrente fixo. Nesse grupo de pacientes, os autores verificaram que quanto maior o valor da PEEP, a distribuição pulmonar do volume corrente sofria redução significativa (Gattinoni *et al.*, 1995). Embora seja tendência a redução do volume corrente no intuito de limitar a lesão por distensão alveolar, Tsuno e colaboradores (1990) demonstraram que o volume corrente baixo pode levar à atelectasia progressiva e, conseqüentemente, à hipóxia (Tsuno *et al.*, 1990). Egbert e colaboradores (1963) demonstraram que manobras de recrutamento como o suspiro associado ao volume corrente baixo são utilizados em pacientes sob anestesia geral para restaurar a complacência pulmonar e melhorar a oxigenação arterial (Egbert L.D., 1963), tais evidências corroboram o resultado do presente estudo em que não houve distúrbio ácido-básico na gasometria dos grupos analisados.

As manobras de recrutamento, particularmente o suspiro tem se mostrado efetivas em pacientes com SDRA em ventilação mecânica como forma de induzir o recrutamento alveolar, preservar as trocas gasosas e os volumes pulmonares de forma adequada (Pelosi, Cadringer, *et al.*, 1999; Foti *et al.*, 2000). Dessa forma, para avaliar se o suspiro agia como medida protetora ao processo inflamatório no organismo submetido à VMI, foi analisado o influxo de células no LBA. A ventilação mecânica gera processos inflamatórios locais e sistêmicos e, uma das formas de indução de lesão é a conversão de um estímulo mecânico (como o estiramento cíclico do epitélio e do endotélio) em sinais bioquímicos e moleculares (Kuchnicka e Maciejewski, 2013; Sutherasan, Y. *et al.*, 2014). Hirsch e colaboradores (2014) avaliaram a resposta inflamatória em ratos Sprague-Dawley submetidos à VMI associado ou não à exposição à fumaça de cigarro para determinar a resposta inflamatória à esses dois estímulos, com parâmetros ventilatórios de VC: 10 mL/Kg, PEEP: 4 cmH<sub>2</sub>O, FiO<sub>2</sub>: 21% e 4h de ventilação. Os autores observaram diferença significativa entre os neutrófilos no LBA mesmo em ratos expostos apenas à ventilação quando comparados ao controle (Hirsch *et al.*, 2014). Em outro estudo realizado em camundongos C57/BL6 sob VMI durante 6 horas (VC: 10 mL/Kg), também foi observado aumento no infiltrado de neutrófilos no LBA (Chess *et al.*, 2010). Em conformidade com tais estudos nossos resultados mostraram um aumento de leucócitos totais no LBA no grupo GVM

comparado ao grupo controle, bem como aumento do influxo de neutrófilos. Já no grupo que foi ventilado e foi realizada a manobra de recrutamento (40 suspiros/hora) o recrutamento de neutrófilos foi menor que no grupo apenas submetido a VMI

O aumento do número de células inflamatórias promove um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, o desequilíbrio redox (Valko *et al.*, 2007), que consiste no desequilíbrio entre a proporção de agentes antioxidantes e oxidantes no organismo, portanto, a VMI contribui com esse desequilíbrio pelo estiramento físico repetitivo que provoca liberação das espécies reativas de oxigênio (ERO) no parênquima pulmonar (Powers *et al.*, 2002; Syrkina *et al.*, 2008). As espécies reativas exercem importante influência nos músculos esqueléticos e, em especial, na musculatura respiratória (Aldini *et al.*, 2001; Van Gammeren *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2007). Mazullo e colaboradores (2012) demonstraram que a contração nos músculos respiratórios na VMI estabeleceu uma isquemia transitória seguida de reperfusão, caracterizando o paradoxo do oxigênio, em que a falta de oxigênio seguida da reperfusão gerou aumento de EROs, o que levou o estresse oxidativo (Mazullo Filho *et al.*, 2012). O estresse oxidativo é então considerado pilar na disfunção muscular respiratória induzida pela VMI, representada principalmente pela miólise diafragmática, o que dificulta o desmame e, conseqüentemente, aumenta o tempo de VMI (Aldini *et al.*, 2001; Collins, 2004).

Nos nossos resultados, houve alteração da defesa antioxidante nos animais submetidos a VMI comparados ao controle, bem como aumento do dano tecidual demonstrado pela peroxidação lipídica. Em relação aos grupos sob ventilação mecânica, constatou-se que o suspiro promoveu diminuição nos níveis de marcadores do estresse oxidativo quando comparado com a VMI, sem manobra, o que direciona para o potencial benéfico dessa manobra.

Vários são os estímulos para a liberação sistêmica de mediadores inflamatórios e recrutamento de neutrófilos, a ventilação mecânica constitui um importante estímulo pelo estiramento cíclico pulmonar que gera (Grommes e Soehnlein, 2011). Especificamente, as citocinas são moléculas que desempenham importante papel de sinalização, podendo iniciar ou perpetuar respostas inflamatórias locais ou sistêmicas e, são produzidas por células epiteliais alveolares, macrófagos residentes e neutrófilos (Park *et al.*, 2001; Halbertsma *et al.*, 2005; Curley *et al.*, 2016). Dentre as citocinas, existe um agrupamento específico de moléculas denominadas de quimiocinas, que agem em receptores acoplados à proteína G (Proudfoot, 2002; Puneet *et al.*, 2005; Bhatia *et al.*, 2012), as quimiocinas são moléculas de baixo peso molecular, que tem a cisteína como composto comum em sua estrutura e tem como função

coordenar desenvolvimento, diferenciação, migração e funções efetoras dos leucócitos, regulando respostas inatas e adaptativas (Yoshie *et al.*, 2001; Navratilova, 2006). As quimiocinas são bastante específicas, ou seja, cada uma irá induzir o recrutamento de subtipos bem definidos de leucócitos (Murphy *et al.*, 2000; Griffith *et al.*, 2014). Dependendo da posição das cisteínas as principais são divididas em CXC, conhecidas como alfa-quimiocinas, em geral quimiotáticas de neutrófilos, e CC, em geral são quimiotáticos de monócitos e alguns tipos de leucócitos (Luster e Ravetch, 1987; Oppenheim *et al.*, 1991). As quimiocinas podem ser classificadas em inflamatórias, homeostáticas e com dupla função (inflamatória e homeostática). As quimiocinas inflamatórias podem ser induzidas no sítio da infecção e dentre essas podemos destacar: CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11 e CCL13, já as homeostáticas estão envolvidas na quimiotaxia durante o desenvolvimento dos tecidos e incluem: CCL18, CCL19, CCL21, CCL25 e CCL27. No terceiro grupo estão inclusas CCL14, CCL15, CCL16 e CCL23 (Raz e Mahabaleshwar, 2009); (Rossi e Zlotnik, 2000; Le *et al.*, 2004).

No presente estudo, realizamos ensaio imunoenzimático para a análise dos marcadores inflamatórios: CCL2, CCL3, CCL5, IL-1, IL-6 e TNF no processo inflamatório pulmonar. Observamos que os níveis de CCL2 e CCL3, quimiocinas pró-inflamatórias, não variaram entre todos os grupos analisados. A CCL2, também conhecida como proteína quimiotática de monócito-1/ligante do receptor de quimiocina 2, realiza a quimiotaxia de monócitos, e em altas concentrações induz o “*respiratory burst*” que gera ERO (Jiang *et al.*, 1992). Os monócitos utilizam diferentes moléculas quimiotáticas para migrar, a CCL2 é rapidamente produzida por células estromais após a ativação dos receptores padrão, apresenta-se aumentada em doenças como melanoma e na artrite reumatoide e está relacionada ao recrutamento de monócitos para o sítio da inflamação (Altemeier *et al.*, 2004), enquanto a CCL3 (também denominada de MIP-1 $\alpha$ ) também está relacionada à recrutamento de leucócitos (Patel *et al.*, 2001), porém após 1h de VM, não induziu alteração nos níveis dessas quimiocinas. Já em relação a quimiocina CCL5, também conhecida como RANTES do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*, que é expressa por uma diversidade de células das quais podemos destacar as células epiteliais do pulmão e está relacionada com estimulação de monócitos, basófilos e quimiotaxia de linfócitos T, monócitos e eosinófilo (Rot *et al.*, 1992). Em nosso estudo foi observado níveis aumentados de CCL5 no grupo VM40 comparado ao grupo controle, provavelmente ocasionado pela maior frequência de suspiros ajustados ao ventilador mecânico, porém não foi observado aumento do influxo leucocitário neste grupo.



Dentre as interleucinas avaliadas, a IL-1 é uma citocina pró-inflamatória, que atua em quase todos os tipos celulares, principalmente em conjunto com outras citocinas ou pequenas moléculas mediadoras como por exemplo o fator de necrose tumoral, outra citocina pró inflamatória. A IL-1 possui importância crucial na defesa do hospedeiro aumentando a temperatura corporal, induzindo uma variedade de linfocinas e proteínas de fase aguda, entretanto em alguns casos de lesão tecidual, os níveis elevados de IL-1 podem contribuir para processos patológicos como fibrose do tecido envolvido (Dinarello *et al.*, 1987). A síntese, processamento, secreção e atividade da IL-1 são eventos fortemente regulados, a margem entre o benefício clínico e a toxicidade em humanos é extremamente estreita, de forma que qualquer intervenção na produção e ou atividade da IL-1 pode ter grande impacto na clínica por ser tratar de molécula altamente inflamatória (Dinarello, 1997; 1998). Alguns estudos vêm sendo realizados no intuito de intervir na IL-1: um estudo em hamsters mostrou que a administração de IL-1 administrada intratraquealmente causou o acúmulo de neutrófilos pulmonares e a lesão pulmonar aguda (Patton *et al.*, 1995), em seres humanos a IL-1 e os neutrófilos estão aumentados nos pulmões de pacientes com a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), em ratos que receberam IL-1 intratraquealmente rapidamente desenvolveram acumulação de neutrófilos no pulmão e um derrame pulmonar agudo dependente de neutrófilos, mas de forma interessante alguns achados apontam para possíveis efeitos duais da IL-1 ao mostrar uma série de pesquisas em que o pré-tratamento com IL-1 poderia prevenir edema pulmonar em ratos (Guidot *et al.*, 1994; Repine, 1994; Hybertson *et al.*, 1997). Em nosso estudo, demonstramos que houve aumento nos níveis de IL-1 e TNF no parênquima pulmonar dos animais submetidos à ventilação mecânica em relação ao grupo controle, e observamos um efeito benéfico da inclusão do suspiro nas diferentes frequências avaliadas (GVM20 e GVM40) nestes animais submetidos a VM, nossos achados sugerem que o suspiro pode contribuir de alguma forma com a redução de expressão de IL-1, mas os mecanismos precisam ser elucidados.

De modo similar, a IL-6 também é uma interleucina pró-inflamatória e desempenha atividades biológicas importantes no aumento da produção de proteínas de fase aguda, em vários eventos inflamatórios como produção e regulação de anticorpos (e autoanticorpos), diferenciação de células B, ativação de células T, hematopoiese, angiogênese, permeabilidade vascular, diferenciação de osteoclastos, regulação metabólica e funções neurais (Ghandadi e Sahebkar, 2017; Song *et al.*, 2019). Estudos recentes têm mostrado avanços no bloqueio de IL-

6 para o tratamento de doenças autoimunes, na tentativa de minimizar alguns efeitos colaterais metabólicos e infecções bacterianas (Hirano, 1992; Rose-John, 2018). A IL-6 está envolvida na patogênese de diferentes doenças inflamatórias, e de forma interessante, demonstramos que o suspiro (20/hora e 40/hora) diminuiu os níveis de IL-6 que estavam aumentados nos animais submetidos a ventilação mecânica (Ishihara e Hirano, 2002).

Naturalmente, o sistema imunológico inato constitui uma linha de defesa contra patógenos ou fatores indutores ao liberar múltiplas citocinas inflamatórias que auxiliam no combate ao agente infeccioso e induzem como cascatas outras respostas imunes (Hackett, 2003; London *et al.*, 2010). Entretanto, uma liberação exacerbada de citocinas tem efeitos mais deletérios sobre a fisiologia do organismo que os próprios microrganismos invasores e podem provocar lesão endotelial, causando edema tecidual, falência de órgãos e morte (Nathan, 2002). Um tempo prolongado de VMI pode ser considerado um fator indutor para liberação de citocinas, causar influxo de neutrófilos e liberação de proteases (Matthay *et al.*, 2012), o que torna nossos dados de grande relevância científica, uma vez que demonstramos uma diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias através de uma manobra de recrutamento, o suspiro. Recentemente, Truflandier e colaboradores (2018), avaliaram os efeitos da VM em ratos durante 24 horas e evidenciaram que a VMI contribuiu para um aumento nos níveis de TNF e inflamação medular, e ressaltaram que o tratamento tradicional para a insuficiência respiratória afeta órgãos distantes por meio de inflamação sistêmica (Truflandier, 2018), sendo necessária inserção de novas formas de tratamento ou medidas protetoras.

Por último, foram realizados estudos estereológicos nos parênquima pulmonar, segundo Weibel a estereologia de pulmões humanos ou de ratos levam à várias descobertas sobre a arquitetura pulmonar como um todo e sobre suas estruturas (Weibel, 2001; Weibel *et al.*, 2007; Weibel, 2008; Schneider e Ochs, 2013), (Knust *et al.*, 2009). No presente estudo, não houve diferenças nas análises estereológicas entre os grupos avaliados, demonstrando que a submissão à VMI de curta duração não foi o suficiente para causar dano estrutural na arquitetura pulmonar.

## **8 CONCLUSÃO**

Demonstramos que a ventilação mecânica invasiva em curta duração, mesmo com volume corrente próximo ao fisiológico foi capaz de induzir respostas inflamatórias e estresse oxidativo nas vias aéreas e no parênquima pulmonar com dados inéditos. Neste estudo, sugerimos que o suspiro, uma manobra de recrutamento, foi eficaz na proteção de ratos Wistar saudáveis submetidos a ventilação mecânica.

## 9 REFERÊNCIAS

ACOSTA, P.; SANTISBON, E.; VARON, J. "The Use of Positive End-Expiratory Pressure in Mechanical Ventilation". **Critical Care Clinics**, v. 23, n. 2, p. 251-261, 2007/04/01/ 2007. ISSN 0749-0704. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749070406000819> >.

ADEWALE, L. Anatomy and assessment of the pediatric airway. **Paediatr Anaesth**, v. 19 Suppl 1, p. 1-8, Jul 2009. ISSN 1155-5645. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9592.2009.03012.x> >.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Academic Press**, v. 105, p. 121-126, 1984. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

AHMED, S.; DANIEL MARTIN, A.; SMITH, B. K. Inspiratory Muscle Training in Patients with Prolonged Mechanical Ventilation: Narrative Review. **Cardiopulm Phys Ther J**, v. 30, n. 1, p. 44-50, Jan 2019. ISSN 1541-7891 (Print)1541-7891. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/cpt.0000000000000092> >.

ALDINI, G. et al. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 9, p. 1043-50, Nov 1 2001. ISSN 0891-5849 (Print)0891-5849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ALTEMEIER, W. A. et al. Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 287, n. 3, p. L533-42, Sep 2004. ISSN 1040-0605 (Print)1040-0605. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00004.2004> >.

ALVES, G. S. et al. Disfunção dos músculos respiratórios de pacientes críticos sob ventilação mecânica por insuficiência respiratória aguda: revisão de literatura. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 14, n. 2, p. 84-90, 2007/08/31 2007. ISSN 2316-9117. Disponível em: < <https://www.revistas.usp.br/fpusp/article/view/75913> >. Disponível em: < <https://www.revistas.usp.br/fpusp/article/download/75913/79408> >.

ANDRADE, M. C. et al. Applying Positive End-Expiratory Pressure During Mechanical Ventilation Causes Pulmonary Redox Imbalance and Inflammation in Rats. **Shock**, Nov 30 2017. ISSN 1073-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/shk.0000000000001072> >.

BAID, H. Patient Safety: Identifying and Managing Complications of Mechanical Ventilation. **Crit Care Nurs Clin North Am**, v. 28, n. 4, p. 451-462, Dec 2016. ISSN 0899-5885. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cnc.2016.07.005> >.

BAIO, T. H., FIORETTO, J. R., NAKATAMI, B. T., RONCHI, C. F., KUROKAWA, C. S., & FERREIRA, A. L. Efeitos de diferentes técnicas de ventilação mecânica e do óxido nítrico inalatório sobre o estresse oxidativo

em lesão pulmonar aguda induzida experimentalmente. **Botucatu: Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de São Paulo.**, 2011.

BALL, M.; PADALIA, D. Anatomy, Airway. 2019/04/05 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >.

BANDEIRA, A. C. B. et al. Lycopene pretreatment improves hepatotoxicity induced by acetaminophen in C57BL/6 mice. **Bioorg Med Chem**, v. 25, n. 3, p. 1057-1065, Feb 1 2017. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.018> >.

BARBAS, C. S. V. et al. Interação cardiopulmonar durante a ventilação mecânica. 05/1998 1998. Disponível em: < [http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS\(=p&nextAction=lnk&exprSearch=234293&indexSearch=ID](http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS(=p&nextAction=lnk&exprSearch=234293&indexSearch=ID) >.

BARBOSA, K. B. F. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 2010. ISSN 1415-5273. Disponível em: < <http://agris.fao.org/agris-search/search.do> >.

BARNETT, W. H. et al. Chemoreception and neuroplasticity in respiratory circuits. **Exp Neurol**, v. 287, n. Pt 2, p. 153-164, Jan 2017. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.05.036> >.

BECKER, D. E.; ROSENBERG, M. B.; PHERO, J. C. Essentials of Airway Management, Oxygenation, and Ventilation: Part 1: Basic Equipment and Devices. **Anesth Prog**, v. 61, n. 2, p. 78-83, Summer 2014. ISSN 0003-3006 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2344/0003-3006-61.2.78> >.

BEN-TAL, A.; TAWHAI, M. H. Integrative approaches for modeling regulation and function of the respiratory system. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 5, n. 6, p. 687-99, Nov-Dec 2013. ISSN 1939-5094 (Print)1939-005X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/wsbm.1244> >.

BENDIXEN, H. H.; HEDLEY-WHYTE, J.; LAVER, M. B. IMPAIRED OXYGENATION IN SURGICAL PATIENTS DURING GENERAL ANESTHESIA WITH CONTROLLED VENTILATION. A CONCEPT OF ATELECTASIS. **N Engl J Med**, v. 269, p. 991-6, Nov 7 1963. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm196311072691901> >.

BENDIXEN, H. H.; SMITH, G. M.; MEAD, J. PATTERN OF VENTILATION IN YOUNG ADULTS. **J Appl Physiol**, v. 19, p. 195-8, Mar 1964. ISSN 0021-8987 (Print)0021-8987. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/jappl.1964.19.2.195> >.

BHATIA, M.; ZEMANS, R. L.; JEYASEELAN, S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 46, n. 5, p. 566-72, May 2012. ISSN 1044-1549. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2011-0392TR> >.

BOEHME, S. et al. PO2 oscillations induce lung injury and inflammation. In: (Ed.). **Crit Care**, v.23, 2019. ISBN 1364-8535 (Print)1466-609X (Electronic).

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**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)0003-2697. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BRISMAR, B. et al. Pulmonary densities during anesthesia with muscular relaxation--a proposal of atelectasis. **Anesthesiology**, v. 62, n. 4, p. 422-8, Apr 1985. ISSN 0003-3022 (Print)0003-3022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/0000542-198504000-00009> >.

BROCHARD, L. Watching what PEEP really does | Request PDF. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 163, n. 6, p. 1291-1292, 2001. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/11967646\\_Watching\\_what\\_PEEP\\_really\\_does](https://www.researchgate.net/publication/11967646_Watching_what_PEEP_really_does) >.

BUEGE, J. A., & AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CAMMAROTA, G. et al. Influence of lung collapse distribution on the physiologic response to recruitment maneuvers during noninvasive continuous positive airway pressure. **Intensive Care Med**, v. 37, n. 7, p. 1095-102, Jul 2011. ISSN 0342-4642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-011-2239-8> >.

CAMPOS, K. K. D. et al. The antioxidant and anti-inflammatory properties of lycopene in mice lungs exposed to cigarette smoke. **J Nutr Biochem**, v. 48, p. 9-20, Oct 2017. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.06.004> >.

\_\_\_\_\_. Temporal analysis of oxidative effects on the pulmonary inflammatory response in mice exposed to cigarette smoke. **Cellular Immunology**, v. 284, n. 1, p. 29-36, 2013/07/01/ 2013. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008874913001172> >.

CARACTA, C. F. Gender differences in pulmonary disease. **Mt Sinai J Med**, v. 70, n. 4, p. 215-24, Sep 2003. ISSN 0027-2507 (Print)0027-2507. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CARD, J. W. et al. Gender differences in murine airway responsiveness and lipopolysaccharide-induced inflammation. **J Immunol**, v. 177, n. 1, p. 621-30, Jul 1 2006. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Gender Differences in Murine Airway Responsiveness and Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. 2006-07-01 2006. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/177/1/621.short> >.

CARO, C. G.; BUTLER, J.; DUBOIS, A. B. SOME EFFECTS OF RESTRICTION OF CHEST CAGE EXPANSION ON PULMONARY FUNCTION IN MAN: AN EXPERIMENTAL STUDY\*†. **J Clin Invest**, v. 39, n. 4, p. 573-83, Apr 1960. ISSN 0021-9738 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CARROLL, M. S. et al. Respiratory and cardiovascular indicators of autonomic nervous system dysregulation in familial dysautonomia. **Pediatr Pulmonol**, v. 47, n. 7, p. 682-91, Jul 2012. ISSN 1099-0496. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.21600> >.

CHEN, L. et al. Molecular Mechanisms of Ventilator-Induced Lung Injury. **Chin Med J (Engl)**, v. 131, n. 10, p. 1225-1231, May 20 2018. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4103/0366-6999.226840> >.

CHERNIACK, N. S. Respiratory Dysrhythmias during Sleep | NEJM. 1981. Disponível em: < <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM198108063050606> >.

CHESS, P. R. et al. Murine mechanical ventilation stimulates alveolar epithelial cell proliferation. **Exp Lung Res**, v. 36, n. 6, p. 331-41, Aug 2010. ISSN 0190-2148. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/01902141003632332> >.

CHIRICO, M. T. T. et al. Tobacco-Free Cigarette Smoke Exposure Induces Anxiety and Panic-Related Behaviours in Male Wistar Rats. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 4943, Mar 21 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23425-z> >.

CHIUMELLO, D. et al. Recruitment maneuvers in acute respiratory distress syndrome and during general anesthesia. **Minerva Anestesiol**, v. 82, n. 2, p. 210-20, Feb 2016. ISSN 0375-9393. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHOWDHURY, O. et al. Respiratory support practices in infants born at term in the United Kingdom. **Eur J Pediatr**, v. 171, n. 11, p. 1633-8, Nov 2012. ISSN 0340-6199. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-012-1784-7> >.

CLAPHAM, L.; HARRISON, J.; RAYBOULD, T. A multidisciplinary audit of manual hyperinflation technique (sigh breath) in a neurosurgical intensive care unit. **Intensive Crit Care Nurs**, v. 11, n. 5, p. 265-71, Oct 1995. ISSN 0964-3397 (Print)0964-3397. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

COIMBRA, R.; SILVERIO, C. Novas estratégias de ventilação mecânica na lesão pulmonar aguda e na Síndrome da Angústia Respiratória Aguda. 2001. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-42302001000400040&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-42302001000400040&script=sci_arttext&tlng=pt) >. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-42302001000400040&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-42302001000400040&script=sci_arttext&tlng=pt) >.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Mol Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 249-61, Mar 2004. ISSN 1073-6085 (Print)1073-6085. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1385/mb:26:3:249> >.

CONSTANTIN, J. M. et al. Recruitment maneuvers in acute respiratory distress syndrome. **Ann Transl Med**, v. 5, n. 14, p. 290, Jul 2017. ISSN 2305-5839 (Print)2305-5839. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2017.07.09> >.

COSTA, D. C. et al. Association of alveolar recruitment maneuvers and prone position in acute respiratory disease syndrome patients. **Rev. bras. ter. intensiva**, v. 21, n. 2, p. 197-203, 06/2009 2009. ISSN 0103-507X. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0103-507X2009000200013&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0103-507X2009000200013&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) >

CREGG, J. M. et al. Phasic inhibition as a mechanism for generation of rapid respiratory rhythms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 48, p. 12815-12820, Nov 28 2017. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1711536114> >.

CUI, Y. et al. The effect of lung recruitment maneuvers on post-operative pulmonary complications for patients undergoing general anesthesia: A meta-analysis. **PLoS One**, v. 14, n. 5, p. e0217405, 2019. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0217405> >.

CURLEY, G. F. et al. Biotrauma and Ventilator-Induced Lung Injury: Clinical Implications. **Chest**, v. 150, n. 5, p. 1109-1117, Nov 2016. ISSN 0012-3692. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2016.07.019> >.

DE PROST, N. et al. Ventilator-induced lung injury: historical perspectives and clinical implications. In: (Ed.). **Ann Intensive Care**, v.1, 2011. p.28. ISBN 2110-5820 (Electronic).

DE SOUZA, A. B. F. et al. High-Fat Diet Increases HMGB1 Expression and Promotes Lung Inflammation in Mice Subjected to Mechanical Ventilation. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 7457054, 2018. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2018/7457054> >.

DEKKER, J. et al. High vs. Low Initial Oxygen to Improve the Breathing Effort of Preterm Infants at Birth: Study Protocol for a Randomized Controlled Trial. **Front Pediatr**, v. 7, p. 179, 2019. ISSN 2296-2360 (Print)2296-2360. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fped.2019.00179> >.



DERUISSEAU, K. C. et al. Mechanical ventilation induces alterations of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm. **J Appl Physiol** (1985), v. 98, n. 4, p. 1314-21, Apr 2005. ISSN 8750-7587 (Print)0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/japplphysiol.00993.2004> >.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 8, n. 4, p. 253-65, Dec 1997. ISSN 1359-6101 (Print)1359-6101. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. **Int Rev Immunol**, v. 16, n. 5-6, p. 457-99, 1998. ISSN 0883-0185 (Print)0883-0185. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/08830189809043005> >.

DINARELLO, C. A. et al. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. **J Immunol**, v. 139, n. 6, p. 1902-10, Sep 15 1987. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DUTSCHMANN, M.; DICK, T. E. Pontine mechanisms of respiratory control. **Compr Physiol**, v. 2, n. 4, p. 2443-69, Oct 2012. ISSN 2040-4603. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c100015> >.

EGBERT L.D., L. M. B., BENDIXEN H. H. Intermittent Deep Breaths and Compliance During Anesthesia in Man. **Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 24, n. 1, p. 57-60, 1963. ISSN 0003-3022. Disponível em: < [https://anesthesiology.pubs.asahq.org/jasa/content\\_public/journal/jasa/931640/0000542-196301000-00009.pdf](https://anesthesiology.pubs.asahq.org/jasa/content_public/journal/jasa/931640/0000542-196301000-00009.pdf) >.

EZURE, K. Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. **Prog Neurobiol**, v. 35, n. 6, p. 429-50, 1990. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 3, p. 232-42, Mar 2006. ISSN 1471-003X (Print)1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1871> >.

FERRIS, B. G.; POLLARD, D. S. EFFECT OF DEEP AND QUIET BREATHING ON PULMONARY COMPLIANCE IN MAN\*†. **J Clin Invest**, v. 39, n. 1, p. 143-9, Jan 1960. ISSN 0021-9738 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FOTI, G. et al. Effects of periodic lung recruitment maneuvers on gas exchange and respiratory mechanics in mechanically ventilated acute respiratory distress syndrome (ARDS) patients. **Intensive Care Med**, v. 26, n. 5, p. 501-7, May 2000. ISSN 0342-4642 (Print)0342-4642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GARCIA, A. J., 3RD; KOSCHNITZKY, J. E.; RAMIREZ, J. M. The physiological determinants of sudden infant death syndrome. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 189, n. 2, p. 288-300, Nov 1 2013. ISSN 1569-9048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2013.05.032> >.

GATTINONI, L. et al. Effects of positive end-expiratory pressure on regional distribution of tidal volume and recruitment in adult respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 151, n. 6, p. 1807-14, Jun 1995. ISSN 1073-449X (Print)1073-449x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.151.6.7767524> >.

\_\_\_\_\_. Ventilator-related causes of lung injury: the mechanical power. **Intensive Care Med**, v. 42, n. 10, p. 1567-1575, Oct 2016. ISSN 0342-4642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-016-4505-2> >.

GERARD F. CURLEY, J. G. L., HAIBO ZHANG, ARTHUR S. SLUTSKY. Biotrauma and Ventilator-Induced Lung Injury Clinical Implications. **Chest Journal**, v. 150, p. 1109-1117, 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GHANDADI, M.; SAHEBKAR, A. Curcumin: An Effective Inhibitor of Interleukin-6. **Curr Pharm Des**, v. 23, n. 6, p. 921-931, 2017. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666161006151605> >.

GILLETTE, M. A.; HESS, D. R. Ventilator-induced lung injury and the evolution of lung-protective strategies in acute respiratory distress syndrome. **Respir Care**, v. 46, n. 2, p. 130-48, Feb 2001. ISSN 0020-1324 (Print)0020-1324. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GOERKE, J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. **Biochim Biophys Acta**, v. 1408, n. 2-3, p. 79-89, Nov 19 1998. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0925-4439\(98\)00060-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0925-4439(98)00060-x) >.

GOMES, R. F. et al. Comparative respiratory system mechanics in rodents. **J Appl Physiol (1985)**, v. 89, n. 3, p. 908-16, Sep 2000. ISSN 8750-7587 (Print)0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/jappl.2000.89.3.908> >.

GONÇALVES, L. O.; CICALI, D. D. Manobra de recrutamento alveolar em anestesia: como, quando e por que utilizá-la. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, n. 6, p. 631-638, 12/2005 2005. ISSN 0034-7094. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0034-70942005000600006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-70942005000600006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) >.

GOZAL D, K.-G. L. The multiple challenges of obstructive sleep apnea in childr... : Current Opinion in Pediatrics. 2018. Disponível em: < [https://journals.lww.com/co-pediatrics/Fulltext/2008/12000/The\\_multiple\\_challenges\\_of\\_obstructive\\_sleep\\_apnea.8.aspx](https://journals.lww.com/co-pediatrics/Fulltext/2008/12000/The_multiple_challenges_of_obstructive_sleep_apnea.8.aspx) >.

GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 659-702, 2014. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145> >.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Mol Med**, v. 17, n. 3-4, p. 293-307, Mar-Apr 2011. ISSN 1076-1551. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2010.00138> >.

GROSU, H. B. et al. Diaphragm muscle thinning in patients who are mechanically ventilated. **Chest**, v. 142, n. 6, p. 1455-1460, Dec 2012. ISSN 0012-3692. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1378/chest.11-1638> >.

GRUBLER, M. R. et al. Basic concepts of heart-lung interactions during mechanical ventilation. **Swiss Med Wkly**, v. 147, p. w14491, 2017. ISSN 0036-7672. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4414/smw.2017.14491> >.

GUIDOT, D. M. et al. Intratracheal but not intravascular interleukin-1 causes acute edematous injury in isolated neutrophil-perfused rat lungs through an oxygen radical-mediated mechanism. **J Lab Clin Med**, v. 123, n. 4, p. 605-9, Apr 1994. ISSN 0022-2143 (Print)0022-2143. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HACKETT, C. J. Innate immune activation as a broad-spectrum biodefense strategy: prospects and research challenges. **J Allergy Clin Immunol**, v. 112, n. 4, p. 686-94, Oct 2003. ISSN 0091-6749 (Print)0091-6749. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/s0091> >.

HAITSMA, J. J. Physiology of Mechanical Ventilation. **Critical Care Clinics**, v. 23, n. 2, p. 117-134, 2007/04/01/ 2007. ISSN 0749-0704. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749070406000753> >.

HALBERTSMA, F. J. et al. Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. **Neth J Med**, v. 63, n. 10, p. 382-92, Nov 2005. ISSN 0300-2977 (Print)0300-2977. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HARTLAND, B. L.; NEWELL, T. J.; DAMICO, N. Alveolar recruitment maneuvers under general anesthesia: a systematic review of the literature. **Respir Care**, v. 60, n. 4, p. 609-20, Apr 2015. ISSN 0020-1324. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4187/respcare.03488> >.

HESS, D. R.; BIGATELLO, L. M. Lung recruitment: the role of recruitment maneuvers. **Respir Care**, v. 47, n. 3, p. 308-17; discussion 317-8, Mar 2002. ISSN 0020-1324 (Print)0020-1324. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HICKEY, S. M.; GIWA, A. O. Mechanical Ventilation. 2019/05/11 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >.

HIRANO, T. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 62, n. 1 Pt 2, p. S60-5, Jan 1992. ISSN 0090-1229 (Print)0090-1229. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HIRSCH, J. et al. Double impact of cigarette smoke and mechanical ventilation on the alveolar epithelial type II cell. **Crit Care**, v. 18, n. 2, p. R50, Mar 25 2014. ISSN 1364-8535. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/cc13795> >.

HSIA, C. C.; HYDE, D. M.; WEIBEL, E. R. Lung Structure and the Intrinsic Challenges of Gas Exchange. **Compr Physiol**, v. 6, n. 2, p. 827-95, Apr 2016. ISSN 2040-4603 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c150028> >.

HYBERTSON, B. M.; LEE, Y. M.; REPINE, J. E. Phagocytes and acute lung injury: dual roles for interleukin-1. **Ann N Y Acad Sci**, v. 832, p. 266-73, Dec 15 1997. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb46253.x> >.

HYPES, C. et al. Failure to achieve first attempt success at intubation using video laryngoscopy is associated with increased complications. **Intern Emerg Med**, v. 12, n. 8, p. 1235-1243, Dec 2017. ISSN 1828-0447. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11739-016-1549-9> >.

IQBAL, Q. et al. Neonatal mechanical ventilation: Indications and outcome. **Indian J Crit Care Med**, v. 19, n. 9, p. 523-7, Sep 2015. ISSN 0972-5229 (Print)0972-5229. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4103/0972-5229.164800> >.

ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 13, n. 4-5, p. 357-68, Aug-Oct 2002. ISSN 1359-6101 (Print)1359-6101. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JAILLON, S.; BERTHENET, K.; GARLANDA, C. Sexual Dimorphism in Innate Immunity. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 56, n. 3, p. 308-321, Jun 2019. ISSN 1080-0549. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12016-017-8648-x> >.

JANSSENS, J. P.; PACHE, J. C.; NICOD, L. P. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. **Eur Respir J**, v. 13, n. 1, p. 197-205, Jan 1999. ISSN 0903-1936 (Print)0903-1936. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JIANG, Y. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **J Immunol**, v. 148, n. 8, p. 2423-8, Apr 15 1992. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JONES, S. E.; DUTSCHMANN, M. Testing the hypothesis of neurodegeneracy in respiratory network function with a priori transected arterially perfused brain stem preparation of rat. **J Neurophysiol**, v. 115, n. 5, p. 2593-607, May 1 2016. ISSN 0022-3077. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/jn.01073.2015> >.

KALUME, F. Sudden unexpected death in Dravet syndrome: Respiratory and other physiological dysfunctions. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 189, n. 2, p. 324-328, 2013/11/01/ 2013. ISSN 1569-9048. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569904813002322> >.

KESZLER, M. Mechanical ventilation strategies. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 22, n. 4, p. 267-274, Aug 2017. ISSN 1744-165x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2017.06.003> >.

KETKO, A. K.; DONN, S. M. Surfactant-associated proteins: structure, function and clinical implications. **Curr Pediatr Rev**, v. 10, n. 2, p. 162-7, 2014. ISSN 1573-3963. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KINNEY, H. C. et al. The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. **Annu Rev Pathol**, v. 4, p. 517-50, 2009. ISSN 1553-4006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092322> >.

KNUST, J. et al. Stereological estimates of alveolar number and size and capillary length and surface area in mice lungs. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 292, n. 1, p. 113-22, Jan 2009. ISSN 1932-8486. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ar.20747> >.

KOCH, H. et al. Stable respiratory activity requires both P/Q-type and N-type voltage-gated calcium channels. **J Neurosci**, v. 33, n. 8, p. 3633-45, Feb 20 2013. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.6390-11.2013> >.

KOH, S. O. Mode of Mechanical Ventilation: Volume Controlled Mode. **Critical Care Clinics**, v. 23, n. 2, p. 161-167, 2007/04/01/ 2007. ISSN 0749-0704. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749070406000789> >.

KREPPEIN, U.; LITTERST, P.; WESTHOFF, M. [Hypercapnic respiratory failure. Pathophysiology, indications for mechanical ventilation and management]. **Med Klin Intensivmed Notfmed**, v. 111, n. 3, p. 196-201, Apr 2016. ISSN 2193-6218. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00063-016-0143-2> >.

KUBIN, L. Neural Control of the Upper Airway: Respiratory and State-Dependent Mechanisms. **Compr Physiol**, v. 6, n. 4, p. 1801-1850, Sep 15 2016. ISSN 2040-4603. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c160002> >.

KUCHNICKA, K.; MACIEJEWSKI, D. Ventilator-associated lung injury. **Anaesthesiol Intensive Ther**, v. 45, n. 3, p. 164-70, Jul-Sep 2013. ISSN 1642-5758. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5603/ait.2013.0034> >.

LAMIA, B. et al. [Cardiopulmonary interactions in the course of mechanical ventilation]. **Rev Mal Respir**, v. 33, n. 10, p. 865-876, Dec 2016. ISSN 0761-8425. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmr.2015.11.013> >.

LARCOMBE, A. N. et al. Sexual dimorphism in lung function responses to acute influenza A infection. **Influenza Other Respi Viruses**, v. 5, n. 5, p. 334-42, Sep 2011. ISSN 1750-2659. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21668688> >.

LE, Y. et al. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. **Cell Mol Immunol**, v. 1, n. 2, p. 95-104, Apr 2004. ISSN 1672-7681 (Print)1672-7681. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LEVINE, S. et al. Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. **N Engl J Med**, v. 358, n. 13, p. 1327-35, Mar 27 2008. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa070447> >.

LI, L. F. et al. Low-molecular-weight heparin reduces hyperoxia-augmented ventilator-induced lung injury via serine/threonine kinase-protein kinase B. **Respir Res**, v. 12, p. 90, 2011. ISSN 1465-993X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21726460> >.

LIESKE, S. P. et al. Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 600, 2000-06-01 2000. ISSN 1546-1726/1546-1726. Disponível em: < [https://www.nature.com/articles/nn0600\\_600](https://www.nature.com/articles/nn0600_600) >.

LIM, C. M. et al. Mechanistic scheme and effect of "extended sigh" as a recruitment maneuver in patients with acute respiratory distress syndrome: a preliminary study. **Crit Care Med**, v. 29, n. 6, p. 1255-60, Jun 2001. ISSN 0090-3493 (Print)0090-3493. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LONDON, N. R. et al. Targeting Robo4-Dependent Slit Signaling to Survive the Cytokine Storm in Sepsis and Influenza. **Sci Transl Med**, v. 2, n. 23, p. 23ra19, Mar 17 2010. ISSN 1946-6234 (Print)1946-6242 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3000678> >.

LOVE, R. et al. Positive end-expiratory pressure decreases mesenteric blood flow despite normalization of cardiac output. **J Trauma**, v. 39, n. 2, p. 195-9, Aug 1995. ISSN 0022-5282 (Print)0022-5282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LOVISARI, F. et al. Effect of PEEP and I:E ratio on cerebral oxygenation in ARDS: an experimental study in anesthetized rabbit. **BMC Anesthesiol**, v. 19, n. 1, p. 110, Jun 19 2019. ISSN 1471-2253. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12871-019-0782-y> >.

LUI, K. et al. Lower versus higher oxygen concentrations titrated to target oxygen saturations during resuscitation of preterm infants at birth. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 5, p. Cd010239, May 4 2018. ISSN 1361-6137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD010239.pub2> >.

LUSTER, A. D.; RAVETCH, J. V. Genomic characterization of a gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site. **Mol Cell Biol**, v. 7, n. 10, p. 3723-31, Oct 1987. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.7.10.3723> >.

MAGNUSSON, L.; SPAHN, D. R. New concepts of atelectasis during general anaesthesia. **Br J Anaesth**, v. 91, n. 1, p. 61-72, Jul 2003. ISSN 0007-0912 (Print)0007-0912. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/bja/aeg085> >.

MAINA, J. N. Fundamental structural aspects and features in the bioengineering of the gas exchangers: comparative perspectives. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, v. 163, p. lii-xii, 1-108, 2002. ISSN 0301-5556 (Print)0301-5556. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MAMEDE, D.; MATEUS, S. R. M.; BARBOSA, F. M. B. Influência da traqueostomia na permanência da ventilação mecânica e no tempo de internação. 2015-11-25 2017. Disponível em: < <http://bdm.unb.br/handle/10483/17356> >.

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**, v. 47, n. 3, p. 469-74, Sep 16 1974. ISSN 0014-2956 (Print)0014-2956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x> >.

MASOUMI, B. 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**, v. 5, n. 5, p. 618-623, Aug 15 2017. ISSN 1857-9655 (Print)1857-9655. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3889/oamjms.2017.072> >.

MATTHAY, M. A.; WARE, L. B.; ZIMMERMAN, G. A. The acute respiratory distress syndrome. **J Clin Invest**, v. 122, n. 8, p. 2731-40, Aug 2012. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci60331> >.



MAURI, T. et al. Patient-ventilator interaction in ARDS patients with extremely low compliance undergoing ECMO: a novel approach based on diaphragm electrical activity. **Intensive Care Med**, v. 39, n. 2, p. 282-91, Feb 2013. ISSN 0342-4642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-012-2755-1> >.

\_\_\_\_\_. Effects of Sigh on Regional Lung Strain and Ventilation Heterogeneity in Acute Respiratory Failure Patients Undergoing Assisted Mechanical Ventilation. **Crit Care Med**, v. 43, n. 9, p. 1823-31, Sep 2015. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/ccm.0000000000001083> >.

\_\_\_\_\_. Pressure support ventilation + sigh in acute hypoxemic respiratory failure patients: study protocol for a pilot randomized controlled trial, the PROTECTION trial. **Trials**, v. 19, n. 1, p. 460, Aug 29 2018. ISSN 1745-6215. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13063-018-2828-8> >.

MAZULLO FILHO, J. B. R. et al. Os efeitos da ventilação mecânica no estresse oxidativo. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, n. 1, p. 23-29, 03/2012 2012. ISSN 0103-507X. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0103-507X2012000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0103-507X2012000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) >.

MCCLUNG, J. M. et al. Redox regulation of diaphragm proteolysis during mechanical ventilation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 294, n. 5, p. R1608-17, May 2008. ISSN 0363-6119 (Print)0363-6119. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00044.2008> >.

MCMULLEN SARAH M, M. M., ROSE LOUISE, ET AL. Partial Ventilatory Support Modalities in Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome—A Systematic Review. 2012. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0040190> >.

MEBAN, C. The Pathway for Oxygen. Structure and Function in the Mammalian Respiratory System. **J Anat**, v. 141, p. 247, Aug 1985. ISSN 0021-8782 (Print)1469-7580 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MILLER, L.; HUNT, J. S. Sex steroid hormones and macrophage function. **Life Sci**, v. 59, n. 1, p. 1-14, 1996. ISSN 0024-3205 (Print)0024-3205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MILSOM, W. K. et al. Evolutionary trends in airway CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemoreception. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 144, n. 2-3, p. 191-202, Dec 15 2004. ISSN 1569-9048 (Print)1569-9048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2004.06.021> >.

MORRIS, I. R. Functional anatomy of the upper airway. **Emerg Med Clin North Am**, v. 6, n. 4, p. 639-69, Nov 1988. ISSN 0733-8627 (Print)0733-8627. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.



MURPHY, P. M. et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 1, p. 145-76, Mar 2000. ISSN 0031-6997 (Print)0031-6997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MURTA, G. L. et al. Oxidative effects on lung inflammatory response in rats exposed to different concentrations of formaldehyde. **Environ Pollut**, v. 211, p. 206-13, Apr 2016. ISSN 0269-7491. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.054> >.

MUTLU, G. M.; MUTLU, E. A.; FACTOR, P. GI complications in patients receiving mechanical ventilation. **Chest**, v. 119, n. 4, p. 1222-41, Apr 2001. ISSN 0012-3692 (Print)0012-3692. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1378/chest.119.4.1222> >.

NAGATO, A. et al. Hyperoxia-induced lung injury is dose dependent in Wistar rats. **Exp Lung Res**, v. 35, n. 8, p. 713-28, Oct 2009. ISSN 1521-0499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19895324> >.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-52, Dec 19-26 2002. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature01320> >.

NAVRATILOVA, Z. Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 150, n. 2, p. 191-204, Nov 2006. ISSN 1213-8118 (Print)1213-8118. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

OLIVEIRA, M. H. B. D. et al. Partial sternotomy for management of iatrogenic brachiocephalic trunk injury during tracheotomy. **J. vasc. bras.**, v. 17, n. 2, p. 148-151, 06/2018 2018. ISSN 1677-5449. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1677-54492018000200148&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1677-54492018000200148&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) >.

OPPENHEIM, J. J. et al. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. **Annu Rev Immunol**, v. 9, p. 617-48, 1991. ISSN 0732-0582 (Print)0732-0582. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.iy.09.040191.003153> >.

PARINANDI, N. L. et al. Hyperoxia-induced NAD(P)H oxidase activation and regulation by MAP kinases in human lung endothelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 284, n. 1, p. L26-38, Jan 2003. ISSN 1040-0605 (Print)1040-0605. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00123.2002> >.

PARK, W. Y. et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, n. 10 Pt 1, p. 1896-903, Nov 15 2001. ISSN 1073-449X (Print)1073-449x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.164.10.2104013> >.

PARKER, J. C.; HERNANDEZ, L. A.; PEEVY, K. J. Mechanisms of ventilator-induced lung injury. **Crit Care Med**, v. 21, n. 1, p. 131-43, Jan 1993. ISSN 0090-3493 (Print)0090-3493. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PATEL, D. D.; ZACHARIAH, J. P.; WHICHARD, L. P. CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. **Clin Immunol**, v. 98, n. 1, p. 39-45, Jan 2001. ISSN 1521-6616 (Print)1521-6616. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/clim.2000.4957> >.

PATERSON, D. S. Serotonin gene variants are unlikely to play a significant role in the pathogenesis of the sudden infant death syndrome. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 189, n. 2, p. 301-14, Nov 1 2013. ISSN 1569-9048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2013.07.001> >.

PATTON, L. M. et al. Interleukin-1 beta-induced neutrophil recruitment and acute lung injury in hamsters. **Inflammation**, v. 19, n. 1, p. 23-9, Feb 1995. ISSN 0360-3997 (Print)0360-3997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PATWA, A.; SHAH, A. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. **Indian J Anaesth**, v. 59, n. 9, p. 533-541, 2015a. ISSN 0019-5049 (Print)0976-2817 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4103/0019-5049.165849> >.

\_\_\_\_\_. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. **Indian J Anaesth**, v. 59, n. 9, p. 533-41, 2015b. ISSN 0019-5049 (Print)0976-2817 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4103/0019-5049.165849> >.

PELOSI, P. et al. [The sigh in ARDS (acute respiratory distress syndrome)]. **Minerva Anestesiol**, v. 65, n. 5, p. 313-7, May 1999. ISSN 0375-9393 (Print)0375-9393. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Sigh in acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 159, n. 3, p. 872-80, Mar 1999. ISSN 1073-449X (Print)1073-449x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.159.3.9802090> >.

PENA, K. B. et al. The administration of a high refined carbohydrate diet promoted an increase in pulmonary inflammation and oxidative stress in mice exposed to cigarette smoke. In: (Ed.). **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v.11, 2016. p.3207-17. ISBN 1176-9106 (Print)1178-2005 (Electronic).

PENITENTE, A. R. et al. Enalapril in Combination with Benznidazole Reduces Cardiac Inflammation and Creatine Kinases in Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 93, n. 5, p. 976-82, Nov 2015. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0237> >.

POHUNEK, P. Development, structure and function of the upper airways. **Paediatr Respir Rev**, v. 5, n. 1, p. 2-8, Mar 2004. ISSN 1526-0542 (Print)1526-0542. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2003.09.002> >.

POWERS, S. K. et al. Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm. **J Appl Physiol (1985)**, v. 92, n. 5, p. 1851-8, May 2002. ISSN 8750-7587 (Print)0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00881.2001> >.

\_\_\_\_\_. Ventilator-induced diaphragm dysfunction: cause and effect. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 305, n. 5, p. R464-77, Sep 2013. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00231.2013> >.

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**, v. 122, n. 4, p. 1382-8, Oct 2002. ISSN 0012-3692 (Print)0012-3692. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1378/chest.122.4.1382> >.

PROUDFOOT, A. E. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 2, p. 106-15, Feb 2002. ISSN 1474-1733 (Print)1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri722> >.

PUNEET, P.; MOOCHHALA, S.; BHATIA, M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 288, n. 1, p. L3-15, Jan 2005. ISSN 1040-0605 (Print)1040-0605. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00405.2003> >.

RAMANANTSOA N, G. J. Congenital Central Hypoventilation Syndrome - NORD (National Organization for Rare Disorders). 2018. Disponível em: < <https://rarediseases.org/rare-diseases/congenital-central-hypoventilation-syndrome/> >.

RAMIREZ, J.-M. Chapter 6 - The Integrative Role of the Sigh in Psychology, Physiology, Pathology, and Neurobiology. In: HOLSTEGE, G.; BEERS, C. M., et al (Ed.). **Progress in Brain Research**: Elsevier, v.209, 2014. p.91-129. ISBN 0079-6123.

RAMIREZ, J. M. The integrative role of the sigh in psychology, physiology, pathology, and neurobiology. **Prog Brain Res**, v. 209, p. 91-129, 2014. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-63274-6.00006-0> >.

RAMIREZ, J. M. et al. Central and Peripheral factors contributing to Obstructive Sleep Apneas. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 189, n. 2, p. 344-53, Nov 1 2013. ISSN 1569-9048 (Print)1878-1519 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2013.06.004> >.

RAMIREZ, J. M.; WARD, C. S.; NEUL, J. L. Breathing challenges in Rett syndrome: lessons learned from humans and animal models. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 189, n. 2, p. 280-7, Nov 1 2013. ISSN 1569-9048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2013.06.022> >.

RAZ, E.; MAHABALESHWAR, H. Chemokine signaling in embryonic cell migration: a fisheye view. **Development**, v. 136, n. 8, p. 1223-9, Apr 2009. ISSN 0950-1991 (Print)0950-1991. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1242/dev.022418> >.

REKLING, J. C.; FELDMAN, J. L. PreBotzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. **Annu Rev Physiol**, v. 60, p. 385-405, 1998. ISSN 0066-4278 (Print)0066-4278. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.385> >.

REPINE, J. E. Interleukin-1-mediated acute lung injury and tolerance to oxidative injury. **Environ Health Perspect**, v. 102 Suppl 10, p. 75-8, Dec 1994. ISSN 0091-6765 (Print)0091-6765. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.94102s1075> >.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 357-63, 1994. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33041-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33041-7) >.

RICHTER, D. W. Generation and maintenance of the respiratory rhythm. **J Exp Biol**, v. 100, p. 93-107, Oct 1982. ISSN 0022-0949 (Print)0022-0949. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ROCCO, P. R.; DOS SANTOS, C.; PELOSI, P. Pathophysiology of ventilator-associated lung injury. **Curr Opin Anaesthesiol**, v. 25, n. 2, p. 123-30, Apr 2012. ISSN 0952-7907. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/ACO.0b013e32834f8c7f> >.

ROCCO, P. R.; PELOSI, P.; DE ABREU, M. G. Pros and cons of recruitment maneuvers in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Expert Rev Respir Med**, v. 4, n. 4, p. 479-89, Aug 2010. ISSN 1747-6348. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1586/ers.10.43> >.

ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 Family Cytokines. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 10, n. 2, Feb 1 2018. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a028415> >.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 217-42, 2000. ISSN 0732-0582 (Print)0732-0582. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.217> >.

ROT, A. et al. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. **J Exp Med**, v. 176, n. 6, p. 1489-95, Dec 1 1992. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.176.6.1489> >.

SAHETYA, S. K.; BROWER, R. G. Lung Recruitment and Titrated PEEP in Moderate to Severe ARDS: Is the Door Closing on the Open Lung? **Jama**, United States, v. 318, n. 14, p. 1327-1329, 2017. ISSN 1538-3598 (Electronic)0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2017.13695> >.

SAHETYA, S. K.; MANCEBO, J.; BROWER, R. G. Fifty Years of Research in ARDS. Vt Selection in Acute Respiratory Distress Syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 196, n. 12, p. 1519-1525, Dec 15 2017. ISSN 1073-449x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201708-1629CI> >.

SANTOS, R. S. et al. Recruitment maneuvers in acute respiratory distress syndrome: The safe way is the best way. **World J Crit Care Med**, v. 4, n. 4, p. 278-86, Nov 4 2015. ISSN 2220-3141 (Print)2220-3141 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5492/wjccm.v4.i4.278> >.

SARAN, M.; BORDONI, B. Anatomy, Head and Neck, Larynx Vocal Cords. **StatPearls**, Treasure Island (FL), 2019. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SCHARF, S. M. et al. Hemodynamic effects of positive-pressure inflation. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 49, n. 1, p. 124-31, Jul 1980. ISSN 0161-7567 (Print)0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/jappl.1980.49.1.124> >.

SCHEPENS, T. et al. The course of diaphragm atrophy in ventilated patients assessed with ultrasound: a longitudinal cohort study. **Crit Care**, v. 19, p. 422, Dec 7 2015. ISSN 1364-8535. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-015-1141-0> >.

SCHETTINO, G. P. P. et al. Ventilação mecânica não invasiva com pressão positiva. **J. bras. pneumol.**, v. 33, p. 92-105, 07/2007 2007. ISSN 1806-3713. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1806-37132007000800004&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1806-37132007000800004&lng=en&nrm=iso&tlng=es) >.

SCHNEIDER, J. P.; OCHS, M. Stereology of the lung. **Methods Cell Biol**, v. 113, p. 257-94, 2013. ISSN 0091-679X (Print)0091-679x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-407239-8.00012-4> >.

SCHONHOFER, B. [Mechanical Ventilation - Essentials of 4 German Guidelines]. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 143, n. 11, p. 793-796, Jun 2018. ISSN 0012-0472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1055/a-0555-5979> >.

SCHREIHOFER, A. M.; GUYENET, P. G. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. **J Comp Neurol**, v. 387, n. 4, p. 524-36, Nov 3 1997. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SHY, B. D. et al. Time to intubation and survival in prehospital cardiac arrest. **Prehosp Emerg Care**, v. 8, n. 4, p. 394-9, Oct-Dec 2004. ISSN 1090-3127 (Print)1090-3127. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SILVA, P. E. et al. Safety and feasibility of a neuromuscular electrical stimulation chronaxie-based protocol in critical ill patients: A prospective observational study. **J Crit Care**, v. 37, p. 141-148, 02 2017. ISSN 1557-8615. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27732921> >.

SLUTSKY, A. S. History of Mechanical Ventilation. From Vesalius to Ventilator-induced Lung Injury. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 191, n. 10, p. 1106-15, May 15 2015. ISSN 1073-449x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201503-0421PP> >.

SLUTSKY, A. S.; RANIERI, V. M. Ventilator-induced lung injury. **N Engl J Med**, v. 369, n. 22, p. 2126-36, Nov 28 2013. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1208707> >.

SMALLWOOD, C. D.; DAVIS, M. D. Year in Review 2018: Pediatric Mechanical Ventilation. **Respir Care**, v. 64, n. 7, p. 855-863, Jul 2019. ISSN 0020-1324. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4187/respcare.07029> >.

SMITH, J. C. et al. Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1529, p. 2577-87, Sep 12 2009. ISSN 0962-8436. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2009.0081> >.

\_\_\_\_\_. Pre-Bötzinger Complex: A Brainstem Region That May Generate Respiratory Rhythm in Mammals. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 726-9, Nov 1 1991. ISSN 0036-8075 (Print)1095-9203 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SOARES, N. P. et al. The Effects of the Combination of a Refined Carbohydrate Diet and Exposure to Hyperoxia in Mice. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1014928, 2016. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1014928> >.

SONG, J. et al. The correlation between low vitamin D status and renal interleukin-6/STAT3 hyperactivation in patients with clear cell renal cell carcinoma. **Steroids**, v. 150, p. 108445, Jul 8 2019. ISSN 0039-128x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108445> >.

SOWERS, L. P. et al. Sudden unexpected death in epilepsy: Fatal post-ictal respiratory and arousal mechanisms. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 189, n. 2, p. 315-323, 2013/11/01/ 2013. ISSN 1569-9048. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156990481300150X> >.

SUDY, R. et al. Different contributions from lungs and chest wall to respiratory mechanics in mice, rats, and rabbits. **J Appl Physiol (1985)**, v. 127, n. 1, p. 198-204, Jul 1 2019. ISSN 0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00048.2019> >.

SUTHERASAN, Y.; D'ANTINI, D.; PELOSI, P. Advances in ventilator-associated lung injury: prevention is the target. <http://dx.doi.org/10.1586/17476348.2014.890519>, 7 Mar 2014 2014. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/17476348.2014.890519> >.

SUTHERASAN, Y.; VARGAS, M.; PELOSI, P. Protective mechanical ventilation in the non-injured lung: review and meta-analysis. **Crit Care**, v. 18, n. 2, p. 211, 2014. ISSN 1364-8535 (Print)1466-609X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/cc13778> >.

SYRKINA, O. et al. Oxidant stress mediates inflammation and apoptosis in ventilator-induced lung injury. **Respirology**, v. 13, n. 3, p. 333-40, May 2008. ISSN 1323-7799. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1843.2008.01279.x> >.

TABUCHI, A. et al. Acute Lung Injury Causes Asynchronous Alveolar Ventilation That Can Be Corrected by Individual Sighs. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 193, n. 4, p. 396-406, Feb 15 2016. ISSN 1073-449x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201505-0901OC> >.

THANNICKAL, V. J. The paradox of reactive oxygen species: injury, signaling, or both? **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, United States, v. 284, n. 1, p. L24-5, 2003. ISSN 1040-0605 (Print)1040-0605 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00279.2002> >.

TONETTI, T. et al. Driving pressure and mechanical power: new targets for VILI prevention. **Ann Transl Med**, v. 5, n. 14, p. 286, Jul 2017. ISSN 2305-5839 (Print)2305-5839. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2017.07.08> >.

TRUFLANDIER, K., BEAUMONT, E., CHARBONNEY, E., MAGHNI, K., DE MARCHIE, M., & SPAHIJA, J. Mechanical ventilation modulates pro-inflammatory cytokine expression in spinal cord tissue after injury in rats. 2018. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TSUNO, K.; PRATO, P.; KOLOBOW, T. Acute lung injury from mechanical ventilation at moderately high airway pressures. **J Appl Physiol (1985)**, v. 69, n. 3, p. 956-61, Sep 1990. ISSN 8750-7587 (Print)0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/jappl.1990.69.3.956> >.

VALENCA, S. S. et al. Light cigarette smoke-induced emphysema and NFkappaB activation in mouse lung. **Int J Exp Pathol**, v. 87, n. 5, p. 373-81, Oct 2006. ISSN 0959-9673 (Print)0959-9673. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00492.x> >.



VALENÇA, S. D. S. et al. Effects of hyperoxia on Wistar rat lungs. **J. bras. pneumol.**, v. 33, n. 6, p. 655-662, 12/2007 2007. ISSN 1806-3713. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1806-37132007000600008&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1806-37132007000600008&lng=en&nrm=iso&tlng=en) >.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725 (Print)1357-2725. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001> >.

VAN GAMMEREN, D. et al. Reloading the diaphragm following mechanical ventilation does not promote injury. **Chest**, v. 127, n. 6, p. 2204-10, Jun 2005. ISSN 0012-3692 (Print)0012-3692. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1378/chest.127.6.2204> >.

VELDHUIZEN, R. et al. The role of lipids in pulmonary surfactant. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1408, n. 2, p. 90-108, 1998/11/19/ 1998. ISSN 0925-4439. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443998000611> >.

VERTHELYI, D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 6, p. 983-93, Jun 2001. ISSN 1567-5769 (Print)1567-5769. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VIQUERAT, C. E.; RIGHETTI, A.; SUTER, P. M. Biventricular volumes and function in patients with adult respiratory distress syndrome ventilated with PEEP. **Chest**, v. 83, n. 3, p. 509-14, Mar 1983. ISSN 0012-3692 (Print)0012-3692. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1378/chest.83.3.509> >.

VLEMINCX, E.; MEULDERS, M.; ABELSON, J. L. Sigh rate during emotional transitions: More evidence for a sigh of relief. **Biol Psychol**, v. 125, p. 163-172, Apr 2017. ISSN 0301-0511. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsycho.2017.03.005> >.

VLEMINCX, E.; MEULDERS, M.; LUMINET, O. A sigh of relief or a sigh of expected relief: Sigh rate in response to dyspnea relief. **Psychophysiology**, v. 55, n. 2, Feb 2018. ISSN 0048-5772. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/psyp.12979> >.

VOLSKO, T. A. et al. Adherence to Endotracheal Tube Depth Guidelines and Incidence of Malposition in Infants and Children. **Respir Care**, v. 63, n. 9, p. 1111-1117, Sep 2018. ISSN 0020-1324. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4187/respcare.06024> >.

WAGNER, P. D.; SALTZMAN, H. A.; WEST, J. B. Measurement of continuous distributions of ventilation-perfusion ratios: theory. **J Appl Physiol**, v. 36, n. 5, p. 588-99, May 1974. ISSN 0021-8987 (Print)0021-8987. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/jappl.1974.36.5.588> >.



WANG, J. et al. Effect of intermittent hypoxia or hyperoxia on lung development in preterm rat neonates during constant oxygen therapy. **J Cell Biochem**, Jun 27 2019. ISSN 0730-2312. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.29019> >.

WEESE-MAYER, D. E. et al. Familial dysautonomia: frequent, prolonged and severe hypoxemia during wakefulness and sleep. **Pediatr Pulmonol**, v. 43, n. 3, p. 251-60, Mar 2008. ISSN 1099-0496. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.20764> >.

\_\_\_\_\_. Autonomic dysregulation in young girls with Rett Syndrome during nighttime in-home recordings. **Pediatr Pulmonol**, v. 43, n. 11, p. 1045-1060, Nov 2008. ISSN 1099-0496. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.20866> >.

\_\_\_\_\_. Autonomic nervous system dysregulation: breathing and heart rate perturbation during wakefulness in young girls with Rett syndrome. **Pediatr Res**, v. 60, n. 4, p. 443-9, Oct 2006. ISSN 0031-3998 (Print)0031-3998. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1203/01.pdr.0000238302.84552.d0> >.

WEIBEL, E. R. Why measure lung structure? **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, n. 2, p. 314-5, Feb 2001. ISSN 1073-449X (Print)1073-449x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.163.2.hh12-00> >.

\_\_\_\_\_. How to make an alveolus. **European Respiratory Journal**, v. 31, p. 483-485, 2008-03-01 2008. Disponível em: < <https://erj.ersjournals.com/content/31/3/483> >.

WEIBEL, E. R.; HSIA, C. C.; OCHS, M. How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry. **J Appl Physiol (1985)**, v. 102, n. 1, p. 459-67, Jan 2007. ISSN 8750-7587 (Print)0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00808.2006> >.

WHIDDEN, M. A. et al. Oxidative stress is required for mechanical ventilation-induced protease activation in the diaphragm. **J Appl Physiol (1985)**, v. 108, n. 5, p. 1376-82, May 2010. ISSN 0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00098.2010> >.

WIESEN, J. et al. State of the evidence: mechanical ventilation with PEEP in patients with cardiogenic shock. **Heart**, v. 99, n. 24, p. 1812-7, Dec 2013. ISSN 1355-6037. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1136/heartjnl-2013-303642> >.

YOSHIE, O.; IMAI, T.; NOMIYAMA, H. Chemokines in immunity. **Adv Immunol**, v. 78, p. 57-110, 2001. ISSN 0065-2776 (Print)0065-2776. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.



## 10 ANEXOS

Certificado de aprovação da Comissão de ética no uso de animais da UFOP



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

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-I, Sala 29  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone: (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370  
Email: [ceua@ufop.br](mailto:ceua@ufop.br)



### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. **2018/13**, intitulado "**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO SUSPIRO EM RATOS WISTAR ADULTOS SAUDÁVEIS SUBMETIDOS À VENTILAÇÃO MECÂNICA**", que tem como responsável o/a **Prof(a). Dr(a) Frank Silva Bezerra**, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados					
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Peso aprox.	Sexo	Procedência
Ratos Wistar	51	8-10 semanas	290-360g	Machos	CCA/UFOP

Restrição de dieta: ( ) sim ( X ) não

Especificar a dieta:

**Este Certificado expira em:** 01/06/2020

Ouro Preto, 23 de abril de 2018.

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

# Cópia do Resumo aceito para apresentação na XXXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental

Effects of sigh during mechanical ventilation in healthy Wistar rats  
Souza, A. B. F., Silva, A. C. L., Matos, N. A., Cândido, L. S., Castro, T. F., Cangussu, S. D., Bezerra, F. S.,  
Departamento de Ciências Biológicas - UFOP

## Introduction:

Mechanical Ventilation (MV) is an important tool used for the treatment of patients with acute or chronic respiratory failure, considered as a non-physiological resource and can cause metabolic disorders. However, in clinical practice, there are recruitment maneuvers, techniques as sighing, gradual inflation, variable ventilation recognized for their protective effect on the lungs.

## Objectives:

This study aimed to analyze the effects of sigh on lung oxidative stress in healthy adult Wistar rats submitted to MV.

## Methods:

31 male Wistar rats were divided into four groups: control (CG), mechanical ventilation (MVG), mechanical ventilation set at 20 sighs/hour (MV20) and mechanical ventilation set at 40 sighs/hour (MV40). Animals from CG were maintained under spontaneous ventilation for 1h, and MVG, MV20, and MV40 were sedated, anesthetized, paralyzed and mechanically ventilated for 1h (Inspira Advanced Safety Ventilator, Harvard Apparatus) at a tidal volume of 7mL/kg in volume controlled ventilation; respiratory rate of 80 breaths/minute, and positive end-expiratory pressure (PEEP) of 3 cmH<sub>2</sub>O. After ventilation, all animals were euthanized and bronchoalveolar lavage fluid (BALF), arterial blood and lungs were collected for further analysis. The Ethics Committee of the Federal University of Ouro Preto (UFOP) approved the experiments, according to the Protocol n° 2018/13. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism, data were expressed as mean ± SEM or median, minimum and maximum value and p < 0.05 was considered statistically significant.

## Results:

In arterial blood at the end of mechanical ventilation, no changes were observed in O<sub>2</sub> saturation and blood pH between experimental groups. Animals from MV40 group presented higher partial pressure of oxygen (PO<sub>2</sub>) (mmHg) (100.2 ± 3.62) and lower partial pressure of carbon dioxide (PCO<sub>2</sub>) (mmHg) (28.68 ± 0.80) compared to CG (82.17 ± 4.15; 35.37 ± 2.31). The levels of bicarbonate (HCO<sub>3</sub>) (mmol/L) in the MV20 group (18.10 ± 0.59) were lower compared to the CG (21.65 ± 1.55). The ratio between PO<sub>2</sub> and inspired a fraction of oxygen (PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>) was higher in MVG (474.4 ± 18.70) and MV40 (479.2 ± 17.31) compared to CG (393.2 ± 19.87). The cell influx in BALF (x10<sup>5</sup>/mL) was higher in MVG (20.94 ± 1.51) compared to CG (13.75 ± 1.34). Analysis of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (nmol/mg PTN) showed higher oxidation of lipids in MVG (1.69 ± 0.02) compared to CG (0.54 ± 0.15), MV20 (1.08 ± 0.14), MV40 (1.17 ± 0.18). Protein oxidation (nmol/mg PTN) was higher in the mechanical ventilation group (16.70 ± 2.71) when compared to MV40 (8.42 ± 1.44). The superoxide dismutase (SOD) activity (U/mg PTN) was higher in MVG (30.04 ± 1.70) when compared to CG (15.66 ± 2.59), MV20 (19.34 ± 1.47) and MV40 (16.42 ± 3.36). The catalase (CAT) activity (U/mg PTN) was also higher in MVG (2.27 ± 0.31) compared to CG (1.27 ± 0.19), MV20 (1.30 ± 0.17) and MV40 (1.17 ± 0.17).

## Conclusion:

Our data suggest that use of the sigh plays a protective role in the lung decrease the oxidative damages and lung inflammation caused by MV.

## Financial Support:

CNPq, CAPES, FAPEMIG, UFOP and Nova Biomedical Corporation

