

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**A RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR E O
ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS PELA
VENTILAÇÃO MECÂNICA SÃO DEPENDENTES DA
PRESSÃO POSITIVA AO FINAL DE EXPIRAÇÃO**

Mônica Campos Andrade

Ouro Preto, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**A RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR E O
ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS PELA
VENTILAÇÃO MECÂNICA SÃO DEPENDENTES DA
PRESSÃO POSITIVA AO FINAL DE EXPIRAÇÃO**

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim Menezes

Coorientador

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Ouro Preto, 2016

A553r

Andrade, Mônica Campos.

A resposta inflamatória pulmonar e o estresse oxidativo induzidos pela ventilação mecânica são dependentes da pressão positiva ao final de expiração [manuscrito] / Mônica Campos Andrade. - 2016.

xv, 63pf.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim Menezes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Ventilação mecânica. 2. Positive end-expiratory pressure (PEEP). 3. Pulmões - Inflamação. 4. Respiradores (Medicina). I. Bezerra, Frank Silva. II. Menezes, Rodrigo Cunha Alvim . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 577.12

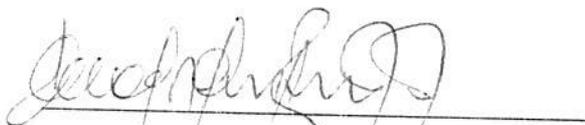
Catálogo: www.sisbin.ufop.br

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

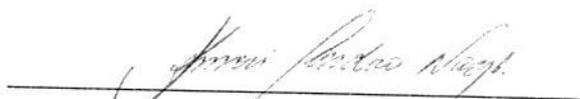
"A inflamação pulmonar e o estresse oxidativo induzidos pela ventilação mecânica são dependentes da pressão positiva ao final da expiração".

Aos vinte e seis dias do mês de outubro de 2016, às 09:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Mônica Campos Andrade**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:



Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca
Júnior
Examinador (UFOP)



Prof. Dr. Akinori Cardozo Nagato
Examinador(UFJF)



Prof. Dr. Frank Silva Bezerra
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: **26/10/2016**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Av. 58 - Pq. Ant. Universidade Federal de Ouro Preto - Campus Umuarama
Instituto de Ciências Biológicas - UFOP - Ouro Preto - MG - Brasil - CEP 35400-000
Fone: (31) 3247-1000 - Fax: (31) 3247-1001 - E-mail: biol@ufop.edu.br - www.ufop.edu.br



Este Trabalho foi realizado no **Laboratório de Fisiopatologia Experimental** e no **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular** do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob auxílio concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à memória do meu pai.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me sustentou e me deu forças para terminar esta jornada.

Agradeço a minha família por compreender minha ausência.

Agradeço a Coluninha, Mari e Zabelê por todo o apoio desde o início.

Ao Helivelton Azevedo e ao Diego Leal por me terem incentivado e me indicado ao meu orientador.

A Keila Karine, por todo o ensinamento passado, toda a paciência e disposição em ajudar. Camila Ramos, pela parceria e conhecimento compartilhado. Aos amigos do laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx), por todo o apoio de que sempre precisei: pelos conselhos e também pelos momentos de descontração. Muito obrigada!

Natália Araújo, Ana Beatriz de Souza, Máira Talma, Thalles de Castro, Pâmela Félix, Josiêlda Gomes, Nícia Pedreira, Karina Pena, Thais Lourenço, Clarissa Nardeli, Dafne Machado e Lucas Antunes. Muito obrigada!

Ao meu coorientador, Professor Dr. Rodrigo Cunha Alvim Menezes, e aos alunos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Aline Rezende, Aline Arlindo, Alessandra Abreu, Luíz Henrique, Franciny Paiva, Sylvana Noronha, Mariana Guedes e, em especial, à Fernanda Silva, obrigada por tudo!

Ao amigo Jacques Horta que esteve presente desde o início.

Agradeço ao Professor Dr. Wanderson Lima pelo apoio e palavras de incentivo.

À professora Dra. Silvia Cangussú e ao professor Dr. Marcelo Eustáquio pela colaboração.

À doutoranda Ana Carla Balthar por toda ajuda e ensinamento.

Ao professor Dr. André Talvani e ao Dr. Guilherme de Paula pelo auxílio na realização dos Ensaio imunoenzimáticos.

Aos técnicos do Laboratório de Nutrição Experimental, Sr. Jair e Aldo, do Laboratório de Bioquímica Renata, do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular Sr Milton e Marli, e do Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Sr. Luiz. Muito obrigada!

Ao Professor Dr. Elísio pela disponibilidade em ajudar.

Aos Professores Dr. Samuel Valença e Dr. Alysson Roncally pela colaboração e todo o apoio enquanto estive na UFRJ.

Agradeço à Mariana abreu, Luciana Camilo, Rodrigo Gaudio por toda ajuda, Manu Lanzeti e Vanessa Ribeiro pela receptividade.

Kaique Torres e Iago Cerqueira por terem me recebido tão bem.

Emanuel Kennedy pela hospedagem, pela parceria e por sua amizade,

E ao meu orientador, professor Dr. Frank Silva Bezerra, que me proporcionou esta oportunidade, obrigada por tudo que me ensinou! Obrigada por não ter desistido! Serei sempre grata por todo o conhecimento adquirido e por todo o apoio que recebi!

RESUMO

A Ventilação Mecânica (VM) é uma importante ferramenta no tratamento do doente crítico, pois substitui total ou parcialmente a ventilação espontânea. A VM pode induzir ou agravar a lesão pulmonar através da produção local de citocinas, do infiltrado inflamatório de neutrófilos e das alterações na permeabilidade da barreira alvéolo-capilar. O uso da pressão positiva ao final da expiração (PEEP), auxilia na melhora das trocas gasosas por evitar o colapso alveolar ao final da expiração. O estudo analisou os efeitos oxidativos e a resposta inflamatória da ventilação mecânica com e sem uso da PEEP em ratos adultos. Dezoito ratos Wistar foram randomizados em três grupos de 6 animais: grupo controle (GC), submetido à ventilação espontânea; grupo PEEP (GP), submetido à VM, modo controlado a volume com PEEP; grupo ZEEP (GZ), submetido à VM, modo controlado a volume sem PEEP. Os animais foram sedados, submetidos à traqueostomia e conectados ao ventilador mecânico por um período de 60 minutos. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e foram coletados o sangue, lavado broncoalveolar (LBA) e os pulmões para as análises bioquímicas e morfométricas. Houve um aumento do número de neutrófilos no LBA do GP comparado ao GC. Houve um aumento nos níveis das citocinas CCL3 do GP, comparado ao GC e GZ; e de CCL5 do GP, comparado ao GC. Houve maior peroxidação lipídica e oxidação de proteínas no GP, comparado ao CG e GZ. Houve um aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) no GP, comparado ao CG e GZ. No entanto, houve uma redução da razão de glutatona, reduzida por glutatona oxidada (GSH/GSSG) no GP, comparado ao GC. Nas análises morfométricas, observamos aumento da área alveolar no GP, comparado ao CG e GZ. Portanto, a VM com uso da PEEP, causou desequilíbrio redox e inflamação nos pulmões de ratos adultos saudáveis.

Palavras chaves: Ventilação mecânica, PEEP, lesão pulmonar, desequilíbrio redox, inflamação.

ABSTRACT

Mechanical ventilation (MV) is an important tool in the treatment of critically ill patients, which substitutes all or part of the spontaneous ventilation. MV may induce or aggravate the lung injury through the production of cytokines, inflammatory infiltration of neutrophils and changes in the permeability of the alveolar-capillary barrier. The use of positive end-expiratory pressure (PEEP) helps improve gas exchanges to avoid alveolar collapse at the end of expiration. This study analyzed the oxidative effects and inflammatory response of mechanical ventilation with and without the use of PEEP in adult rats. Eighteen Wistar rats were randomized into three groups of six animals: control group (CG), subjected to spontaneous ventilation; PEEP group (PG), subjected to volume-controlled MV with PEEP; ZEEP group (ZG), subjected to volume-controlled MV without PEEP. The animals were sedated, submitted to tracheotomy and connected to a mechanical ventilator for a period of 60 minutes. At the end of the experiment, the animals were euthanized and blood, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lungs were collected for biochemical and morphometric analyses. There was an increase in neutrophils in BALF in PG compared with CG. There was an increase in the levels of cytokines CCL3 in PG compared with CG and ZG and CCL5 in PG compared with CG. There was an increase in lipid peroxidation and oxidation of proteins in PG compared with CG and ZG. There was an increase in the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in PG compared with CG and ZG. However, there was a decrease in the ratio of reduced glutathione to oxidized glutathione (GSH / GSSG) in PG compared to CG and ZG. In the morphometric analysis, we observed an increase in the alveolar area in PG compared with CG. Therefore, MV with PEEP caused redox imbalance and inflammation in the lungs of healthy adult rats.

Key words: mechanical ventilation, PEEP, lung injury, redox imbalance, inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS:

Bpm: batimento por minuto

CAT: Catalase

CCL(n°): Ligante do receptor de quimiocina CC(n°)

CCR(n°) : Receptor de Quimiocina do Tipo CCR(n°)

Cest: Complacência estática

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

Cm- Centímetro

d.C.: Depois de Cristo

DC: Débito cardíaco

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

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

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ERN: Espécies reativas de nitrogênio

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FC: Frequência cardíaca

FiO₂: Fração inspirada de oxigênio

FR: Frequência respiratória

GC: Grupo controle

GP: Grupo PEEP

GPx : Glutathione peroxidase

GRd : Glutathione reductase

GSH : Glutathiona reduzida

GSSG: Glutathiona oxidada

GZ: Grupo ZEEP

H&E : Hematoxilina e eosina

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HCl : Ácido clorídrico

HE: Hematoxilina e Eosina

i.v.: Intravenosa

Irpm: incursões respiratórias por minuto

Kg: Quilograma

LABNEX: Laboratório de Nutrição Experimental

LAPAC: Laboratório Piloto de Análises Clínicas

LBA- Lavado broncoalveolar

LIMP: Laboratório de Imunopatologia

LPA: Lesão pulmonar aguda

LPIV: Lesão pulmonar induzida pelo ventilador

LPS: Lipopolisacarídeo

Mg: Miligramas

MIP-1: Proteína Inflamatória de Macrófagos-1

Min: Minuto

ml: Mililitro

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

N₂:Nitrogênio

Na_2HPO_4 : Fosfato de sódio

NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina.

NO : Óxido nítrico

O_2^- : Ânion superóxido

O_2 : Oxigênio

OH : Radical hidroxila

PaCO_2 : Pressão parcial de gás carbônico

PAM: Pressão arterial média

PaO_2 : Pressão parcial de oxigênio

PBS: Tampão fosfato-salino

RANTES: Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (células T normais expressas e secretadas, reguladas na ativação)

SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SOD: Superóxido dismutase

SpO_2 : Saturação de oxigênio

SSA: Ácido de sulfosalicílico

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

UV: Ultravioleta

Vv: Densidade de volume

ZEEP: Zero pressão positiva ao final da expiração.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ventilador tanque.....	5
Figura 2: Pacientes sendo ventilados com o “pulmão de aço” durante epidemia da poliomielite.....	6
Figura 3: Dräger Pulmotor.....	8
Figura 4: Efeitos nocivos da VM causados pela hiperdistensão alveolar e abertura e fechamento cíclicos dos alvéolos.....	10
Figura 5: Mecanismos da lesão pulmonar induzida pelo ventilador	11
Figura 6: Exarcebação da lesão pulmonar induzida pelo pelo ventilador.....	12
Figura 7: Formação das espécies reativas de oxigênio Erro! Indicador não definido.	14
Figura 8: Desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes	15
Figura 9: Mecanismos da lesão pulmonar.....	17
Figura 10: Densidade de volume de septo alveolar.....	39
Figura 11: Densidade de volume alveolar..	Erro! Indicador não definido. 39
Figura 12: Área alveolar.....	40
Figura 13: Fotomicrografias.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes utilizados para obtenção da curva padrão.	32
Tabela 2: Reagentes utilizados para a dosagem.	32
Tabela 3: Parâmetros fisiológicos durante a ventilação mecânica.	34
Tabela 4: Comparação dos parâmetros fisiológicos durante a VM entre os grupos.....	35
Tabela 5: Parâmetros hematológicos dos grupos experimentais.	35
Tabela 6: Leucograma mostrando a contagem das células nos grupos experimentais..	36
Tabela 7: Influxo de células no lavado broncoalveolar dos grupos experimentais.	36
Tabela 8: Análises imunoenzimáticas no homogeneizado pulmonar.....	37
Tabela 9: Avaliações do estresse e danos causados pela oxidação no parênquima pulmonar dos grupos experimentais.	38

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS:.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. História da ventilação artificial.....	4
2.1.1. Ventilação por pressão negativa.....	4
2.1.2. Ventilação por pressão positiva	6
2.2. Lesão pulmonar induzida pelo ventilador.....	9
2.3. Desequilíbrio redox	13
2.3.1. Desequilíbrio redox e lesão pulmonar	15
2.4. Citocinas inflamatórias.....	18
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral:.....	20
3.2. Objetivos específicos:.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS:	21
4.1. Animais:.....	21
4.2. Grupos experimentais:.....	21
4.3. Monitorização cardiovascular:	21
4.3.1. Confecção das cânulas:	21
4.3.2. Canulação da artéria femoral:.....	22
4.3.3. Registro direto da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC):.....	22
4.4. Ventilação Mecânica:	23
4.4.1. Traqueostomia:	23
4.4.2. Parâmetros ventilatórios:	23
4.5. Coleta do sangue.....	24
4.5.1. Esfregaço sanguíneo	24
4.6. Coleta do Lavado Broncoalveolar (LBA).....	25
4.7. Processamento Tecidual:	25
4.7.1. Análises Morfométricas e Estereológicas:	26
4.8. Homogeneizado Pulmonar:	26
4.8.1. Ensaios Imunoenzimáticos do Homogeneizado Pulmonar:.....	27
4.8.2. Biomarcadores de Estresse Oxidativo e Defesa Antioxidante	28

4.9. Análise Estatística.....	33
5. RESULTADOS	34
5.1. Parâmetros Fisiológicos e Hemodinâmicos na VM	34
5.2. Parâmetros Hematológicos.....	35
5.3. Análises imunoenzimáticas	37
5.4. Estresse Oxidativo	38
5.5. Estereologia.....	38
6. DISCUSSÃO:	41
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

A ventilação mecânica (VM) é uma importante terapia de suporte de vida e tratamento da insuficiência respiratória aguda (Singer e Corbridge, 2009; Gattinoni *et al.*, 2010). A VM é coadjuvante indispensável no tratamento de doentes críticos, pois propicia a melhora das trocas gasosas e a redução do trabalho respiratório, podendo ser utilizada de forma não invasiva através de uma interface externa, geralmente uma máscara facial; e de forma invasiva através de um tubo endotraqueal ou cânula de traqueostomia (Barbas *et al.*, 2013). Entretanto, a VM pode gerar ou agravar uma lesão pulmonar pré-existente, a qual é denominada lesão pulmonar induzida pelo ventilador (LPIV) (Hoegl *et al.*, 2008; Chess *et al.*, 2010; Rocco *et al.*, 2012).

Em pacientes sob VM, a pressão positiva nas vias aéreas ao final da expiração (PEEP) é um dos métodos utilizados com a finalidade de recrutar e estabilizar unidades pulmonares em pacientes que apresentam insuficiência respiratória hipoxêmica, bem como hipercapnia (Love *et al.*, 1995; Acosta *et al.*, 2007). O emprego da PEEP, frente a situações de colapso alveolar, está normalmente associado à melhora das trocas gasosas, com consequente aumento da pressão parcial de oxigênio (PaO_2) e diminuição da pressão parcial de gás carbônico (PaCO_2). Essa melhora está relacionada à reabertura de alvéolos colapsados, obtendo-se diminuição do “shunt” pulmonar verdadeiro e do efeito “shunt”, assim como do efeito espaço morto (Barbas *et al.*, 1998). Em contrapartida, níveis não fisiológicos de PEEP podem desencadear uma hiperdistensão alveolar, aumentando o risco da LPIV (Brochard, 2001).

A VM com pressão positiva aumenta a pressão intratorácica que, por sua vez, afeta praticamente todos os órgãos e sistemas do corpo promovendo alterações pulmonares e cardiovasculares (Beyer *et al.*, 1982; Wiesen *et al.*, 2013). Sobre o sistema cardiovascular, a VM com PEEP pode promover efeitos adversos, como: redução do retorno venoso e redução do débito cardíaco (DC) (Mutlu *et al.*, 2001; Wiesen *et al.*, 2013). Em pacientes hipovolêmicos com predisposição à hipotensão

arterial, a redução do DC pode levar a uma redução no fluxo sanguíneo esplâncnico, por exemplo (Mutlu *et al.*, 2001).

O dano ao pulmão, atribuído inicialmente às altas pressões de pico no sistema respiratório, foi denominado barotrauma, pois se acreditava que altas pressões no sistema respiratório poderiam ser lesivas aos pulmões, podendo se manifestar como pneumotórax ou enfisema subcutâneo (Curley *et al.*, 2016). Entretanto, observou-se que as altas pressões nas vias aéreas por si só não causam lesão pulmonar. Neste contexto, foi proposto o termo volutrauma, associado à lesão causada pela ventilação com altos volumes pulmonares (De Prost *et al.*, 2011; Carrasco Loza *et al.*, 2015; Curley *et al.*, 2016). Curley e colaboradores relataram que a aplicação da PEEP, durante a ventilação, promove a abertura dos alvéolos colapsados, revertendo a atelectasia e atenuando assim a lesão ao endotélio pulmonar por abertura e fechamento repetitivos de unidades terminais. Tal mecanismo de lesão foi então denominado de atelectrauma (Curley *et al.*, 2016). O estresse cíclico, durante a VM, induz efeitos adversos nos pulmões, como: ativação de macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, liberação de mediadores inflamatórios, alterações na permeabilidade vascular, aumento na expressão das moléculas de adesão e recrutamento leucocitário (Rocco *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015). Os neutrófilos ativados aderem ao endotélio microvascular e causam lesão da célula endotelial através da liberação de metabólitos tóxicos do oxigênio, resultando em um aumento na permeabilidade microvascular e edema pulmonar. O aumento da produção de radicais livres dentro das células endoteliais provoca uma diminuição nos antioxidantes intracelulares (Syrkina *et al.*, 2008).

O desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes representa um fator importante na exacerbação da inflamação e lesão pulmonar causados por vários estímulos, incluindo a VM (Sun *et al.*, 2015). A lesão pulmonar é um processo complexo em que as citocinas desempenham um importante papel, pois podem iniciar e propagar uma resposta inflamatória sistêmica (Villar *et al.*, 2009). Devido à alteração na barreira do endotélio pulmonar durante a lesão pulmonar, as citocinas liberadas para a circulação podem iniciar ou propagar uma resposta inflamatória sistêmica. Desempenham,

portanto, um papel ativo no desenvolvimento de disfunção de múltiplos órgãos (Villar *et al.*, 2009).

Neste contexto, nosso trabalho teve como objetivo avaliar a resposta inflamatória e o estresse oxidativo em pulmões de ratos sem lesão pulmonar prévia, submetidos à ventilação mecânica com e sem uso da PEEP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. História da ventilação artificial

Baker, Geddes e Kacmarek acreditam que os primeiros relatos sobre a ventilação artificial ocorreram na bíblia: Em Gênesis 2:7 diz “*E formou o Senhor Deus o homem do pó da terra, e soprou em suas narinas o fôlego da vida; e o homem foi feito alma vivente*” e ainda em II Reis 4:34-35 “*E subiu à cama e deitou-se sobre o menino, e, pondo a sua boca sobre a boca dele, e os seus olhos sobre os olhos dele, e as suas mãos sobre as mãos dele, se estendeu sobre ele; e a carne do menino aqueceu. Depois desceu, e andou naquela casa de uma parte para a outra, e tornou a subir, e se estendeu sobre ele, então o menino espirrou sete vezes, e abriu os olhos.*” (Baker, 1971; Geddes, 2007; Kacmarek, 2011).

No século II d.C., o cientista e médico grego Galeno descobriu que a respiração se fazia necessária para manter a circulação sanguínea, por meio de um experimento que utilizou um fole para insuflar os pulmões de um animal que acabara de morrer. Este foi temporariamente reanimado (Baker, 1971; Slutsky, 2015). Em 1530, Paracelsus expôs a teoria de que os animais poderiam ser mantidos vivos através da ventilação artificial; e, em 1555, o médico Andreas Vesalius repetiu o experimento de Galeno e introduziu um tubo na traqueia de um animal e empregou um fole para ventilar artificialmente (Somerson e Sicilia, 1992; Chen *et al.*, 1998; Baskett, 2004). Em 1667, Robert Hooke realizou um experimento para comprovar a hipótese de Galeno. Ele foi o primeiro a descrever que os movimentos do coração e dos pulmões eram independentes (Baker, 1971; Baskett, 2004; Slutsky, 2015).

2.1.1. Ventilação por pressão negativa

John Dalziel (1838) descreveu o primeiro ventilador por pressão negativa (VPN): o ventilador tanque (Figura 1), onde o paciente sentava-se em uma caixa totalmente fechada na região cervical. Havia um êmbolo que era utilizado para diminuir a pressão na caixa torácica, resultando no movimento da inspiração; e o inverso

produzia a expiração. Durante o século 19 e metade do século 20, a VPN foi predominante (Kacmarek, 2011).

Durante a década de 1920, as indústrias elétricas e de fornecimento de gás necessitavam de uma alternativa eficaz para o tratamento de vítimas de choque elétrico e intoxicação por gás. Dr. Cecil Drinker, professor da Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard, e seu irmão, Philip Drinker, engenheiro, desenvolveram em 1929 o ventilador tanque por pressão negativa (Figura 2), que se tornou conhecido como o "pulmão de aço" (Chen et al., 1998; Geddes, 2007; Slutsky, 2015).

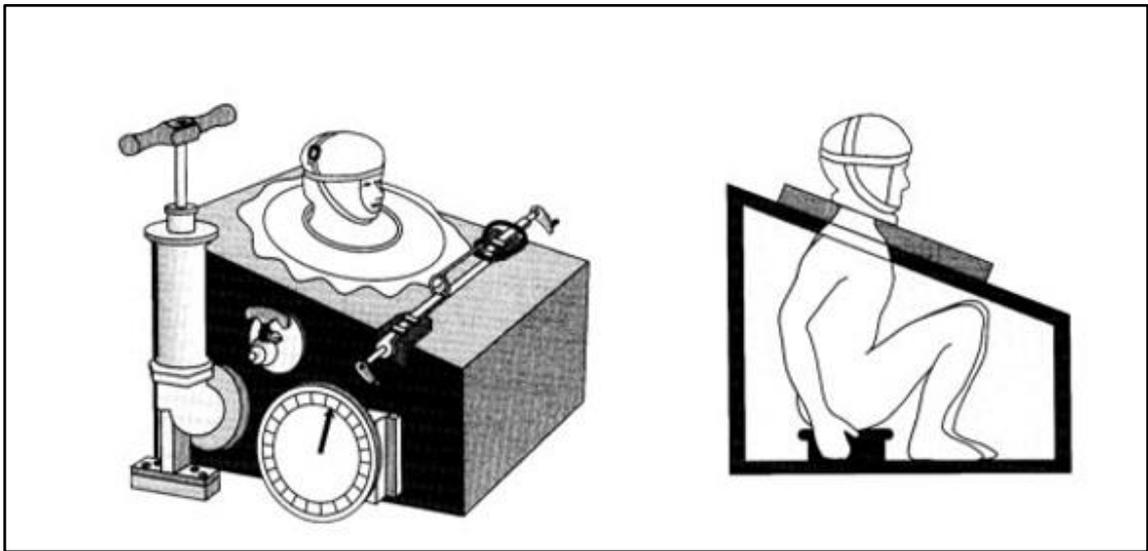


Figura 1: Ventilador tanque. **Fonte:** adaptado de Kacmarek, (2011).

O pulmão de aço era constituído por uma câmara na qual o paciente ficava com a cabeça para fora, um motor elétrico gerava periodicamente pressões subatmosféricas dentro da câmara e provocava a expansão da caixa torácica. Este aumento do volume do tórax fazia decrescer a pressão intratorácica e o ar era então sugado para as vias aéreas, sendo esta a fase inspiratória; e a câmara então retornava à pressão atmosférica, o tórax e abdômen retornavam à posição inicial e o ar era então exalado (Chen *et al.*, 1998; Geddes, 2007; Slutsky, 2015). Tal abordagem de suporte ventilatório atingiu o seu auge durante as epidemias de poliomielite, entre 1930 a 1960, na qual muitas pessoas foram a óbito, devido à paralisia dos músculos respiratórios. As primeiras Unidades de Terapia

Intensiva (UTI's) foram criadas para melhor atendimento de todos os pacientes que apresentavam necessidade de VPN por causa da poliomielite. Na Figura 2, é retratada uma UTI onde vários pacientes estão em uso da VPN (Kacmarek, 2011).



Figura 2: Pacientes sendo ventilados com o “pulmão de aço” durante epidemia da poliomielite. **Fonte:** adaptado de Kacmarek, (2011).

2.1.2. Ventilação por pressão positiva

Em 1951, houve uma conferência internacional sobre a poliomielite em Copenhague, com a presença dos principais especialistas no mundo. No verão seguinte, Copenhague passou por uma grave epidemia de poliomielite, provavelmente desencadeada pelo transporte do vírus durante a conferência do ano anterior. No auge da epidemia, cerca de 50 pacientes por dia eram admitidos no hospital, sendo que a maioria apresentava paralisia bulbar ou dos músculos respiratórios. Havia disponíveis apenas alguns aparelhos de VPN, portanto a mortalidade dos pacientes era extremamente elevada, maior que 80% (Charo e Ransohoff, 2006). Bjorn Ibsen, um médico anestesista, submeteu um dos pacientes a uma traqueostomia e o ventilou com um ressuscitador manual. A partir da demonstração de Ibsen, esta forma de ventilação invasiva por pressão positiva tornou-se o tratamento padrão para a poliomielite na Dinamarca. A mortalidade caiu consideravelmente, de 87% para 40%, e cerca de 1.500

estudantes revezavam na ventilação manual dos pacientes (Kacmarek, 2011; Slutsky, 2015).

Quando a epidemia de poliomielite atingiu a Suécia, em 1953, os suecos já dispunham de um ventilador mecânico, que insuflava os pulmões sem necessitar de auxílio manual dos voluntários. Desta maneira, surgiram os ventiladores por pressão positiva, que se tornaram, nos anos seguintes, o padrão no tratamento da insuficiência respiratória aguda (Paschoal *et al.*, 2007). Antes, porém, desse acontecimento, em 1907, Heinrich Dräger de Lubeck construiu um ressuscitador na Alemanha para uso de emergência em minas e incêndios. Lubeck usou o conceito de pressão positiva na via aérea em um aparelho chamado de Pulmotor (Figura 3) (Kacmarek, 2011). Esse dispositivo ganhou grande popularidade entre a polícia e as unidades de resgate em incêndios na Europa e nos Estados Unidos. Drink e McKhann testaram a eficácia do Pulmotor e julgaram-no ineficaz, devido ao fato de que os pacientes apresentavam resistência ao uso da máscara no rosto e se opunham aos esforços da máquina. Em um paciente, que foi mantido durante dois dias conectado ao Pulmotor, o estômago e o esôfago estavam dilacerados e o conteúdo gástrico estava presente em grandes quantidades no mediastino. Desta forma, a hiperdistensão gástrica tornou-se um perigo para o uso deste dispositivo (Somerson e Sicilia, 1992; Chen *et al.*, 1998; Geddes, 2007).



Figura 3: Dräger Pulmotor. **Fonte:** Adaptado de Kacmarek, (2011).

Em 1957, o engenheiro aeronauta e médico Forrest Bird criou o Bird Mark-7, considerado o primeiro ventilador mecânico invasivo à pressão fabricado em larga escala. Foi utilizado principalmente para fornecer tratamentos intermitentes (Somerson e Sicilia, 1992; Kacmarek, 2011). Até a década de 1960, o principal objetivo do suporte ventilatório era substituir os músculos ventilatórios. Nos anos seguintes, porém, o objetivo passou a ser a correção da hipoxemia (Slutsky, 2015).

Frumin e colaboradores (1959), em um estudo com pacientes anestesiados, correlacionaram a utilização de PEEP a um aumento nos volumes pulmonares e na oxigenação arterial. Mas apenas em 1964, Ashbaugh e colaboradores introduziram a PEEP na prática clínica após observarem maior sobrevida entre os pacientes tratados com PEEP (Slutsky, 2015).

Nos últimos 60 anos, muitos aspectos técnicos de ventiladores foram aprimorados no que diz respeito ao uso de microprocessadores, além do desenvolvimento de novos modos ventilatórios. Entre os anos de 1980 e 1990, houve uma mudança no paradigma da ventilação controlada para suporte ventilatório parcial. O objetivo era a melhor interação e sincronia entre paciente e ventilador. A VM foi originalmente introduzida em pacientes com a função pulmonar normal para substituir a musculatura ventilatória, como nos casos da poliomielite ou durante o uso de anestesia em procedimentos cirúrgicos. Nesses pacientes, a ventilação com baixas pressões era relativamente segura; porém, quando utilizada para auxiliar nas trocas gasosas em pacientes com algum comprometimento pulmonar, tornou-se evidente que os ventiladores de pressão negativa eram ineficazes na manutenção da troca gasosa. Com os avanços tecnológicos, tornou-se predominante o uso da ventilação com pressão positiva, possibilitando o uso de maiores pressões e melhorando a eficácia da troca gasosa. Por outro lado, o aumento excessivo da pressão nas vias aéreas levou ao reconhecimento de efeitos adversos, como por exemplo, o pneumotórax (Slutsky, 2015).

2.2. Lesão pulmonar induzida pelo ventilador

No final dos anos 1960, Foi observado que baixo volume corrente (VC) juntamente com baixos níveis de PEEP estavam associados à atelectasia e hipoxemia. Havia grande relutância em utilizar altas frações inspiradas de oxigênio (FiO_2), devido aos seus efeitos nocivos. Desta forma, os médicos passaram a utilizar altos VC, o que melhorava temporariamente a hipoxemia; todavia, desencadeou lesões pulmonares em muitos pacientes (Slutsky, 2015). No final de 1970, Bone e colaboradores descreveram que pacientes com a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), ventilados com PEEP de 16 ± 4 cmH₂O e VC de 22 ± 4 ml/kg, 40% destes doentes desenvolveram barotrauma grave (Slutsky, 2015). Na década de 1970, o cenário típico da VM no tratamento da SDRA foi um volume corrente (VC) de 12-15 mL/Kg com uma PEEP de 5-10 cmH₂O. Nesse período, houve um grande foco sobre a toxicidade do oxigênio, com base em estudos em animais, que demonstraram um aumento na mortalidade de animais ventilados com uma FiO_2 de 100%, e nas complicações graves em bebês

ventilados com FiO_2 de 100%. No entanto, a partir de meados dos anos 1970, houve um reconhecimento progressivo do dano potencial da VM (Gattinoni *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2016).

Eddy Fan e colaboradores relataram que a lesão pulmonar pode ser causada pela ventilação com altos volumes, assim como baixos volumes pulmonares (Fan *et al.*, 2013). A VM com altos VC leva ao barotrauma, caracterizado por ruptura alveolar e escape aéreo, (Figura 4 A e B) (Slutsky e Ranieri, 2013). A propensão a desenvolver a lesão pulmonar está relacionada em parte à heterogeneidade da complacência do pulmão. Desta forma, as regiões relativamente saudáveis tendem a uma hiperdistensão, enquanto as áreas pulmonares comprometidas progridem para áreas atelectasiadas. Mesmo com baixo VC, o ar desloca-se, preferencialmente, para regiões não colapsadas (Haitsma, 2007). As forças de cisalhamento decorrentes da abertura cíclica das unidades alveolares durante a VM podem dar origem a uma lesão denominada atelectrauma (Figura 4C) (Slutsky e Ranieri, 2013; Lohser e Slinger, 2015; Curley *et al.*, 2016), além de causar a liberação de mediadores, tais como IL-1, TNF- α e IL-8 (Ricard *et al.*, 2001). Tais mediadores podem atuar diretamente nas células ou indiretamente através da transdução destas forças para a ativação de células sinalizadoras epiteliais, endoteliais ou células inflamatórias (Slutsky, 2005). Além disso, elas podem recrutar neutrófilos para o espaço aéreo pulmonar, fazendo com que tais células liberem mais moléculas sinalizadoras. Este processo tem sido designado de biotrauma (Slutsky e Ranieri, 2013; Wang *et al.*, 2016).

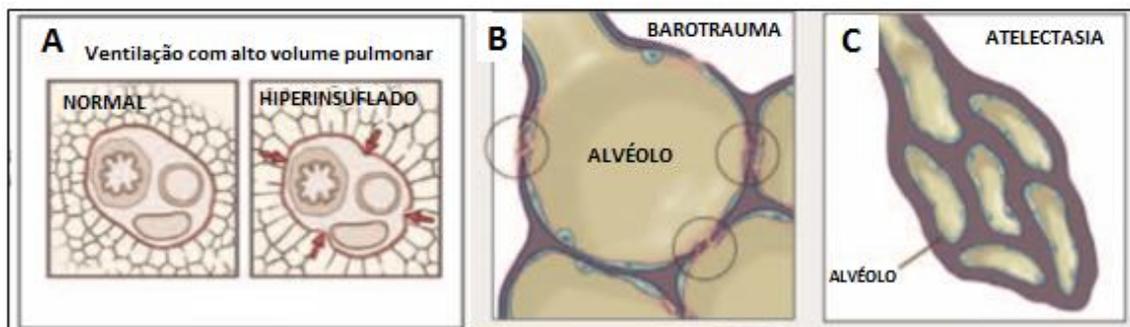


Figura 4: Efeitos nocivos da VM causados pela hiperdistensão alveolar e abertura e fechamento cíclicos dos alvéolos. **Fonte:** Adaptado de Slutsky, (2013).

O reconhecimento da importância da LPIV levou a uma mudança significativa na conduta do tratamento de pacientes em VM. Enquanto, anteriormente, os objetivos da VM foram o de manter as trocas gasosas e minimizar o trabalho de ventilação (Slutsky, 2015), um objetivo adicional foi estabelecido: minimizar a lesão pulmonar induzida pela ventilação (Jabbari *et al.*, 2013).

A VM pode induzir a lesão pulmonar decorrente do estiramento cíclico ou hiperdistensão alveolar que gera lesão endotelial e epitelial, assim como o aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, permitindo o infiltrado de líquido rico em proteínas para o espaço aéreo. Isso resulta na ativação dos macrófagos alveolares com liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, além do aumento na ativação e recrutamento de neutrófilos e deposição de fibrina (Figura 5) (Matthay *et al.*, 2012).

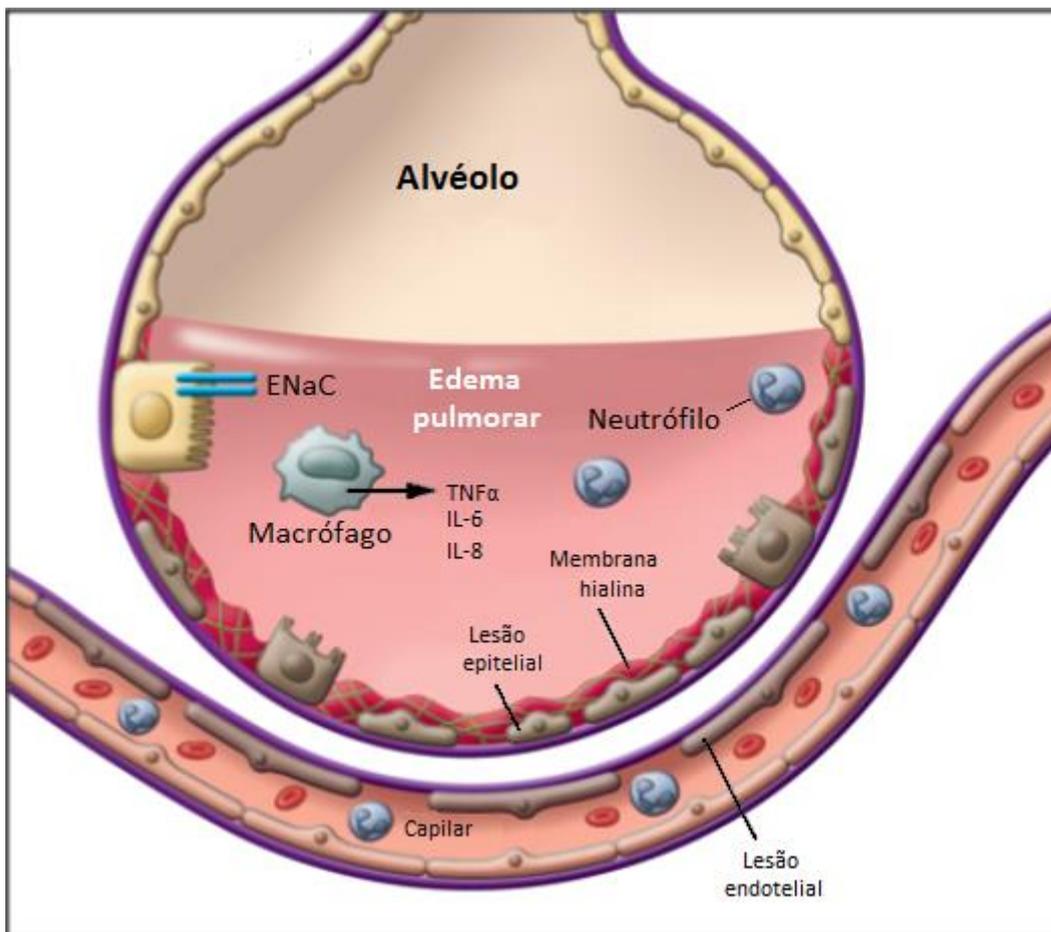


Figura 5: Mecanismos da lesão pulmonar induzida pelo ventilador. **Fonte:** Adaptado de Matthay, (2012)

O tempo prolongado em VM resulta na exacerbação da lesão pulmonar, provocando o aumento da lesão endotelial e epitelial pulmonar e/ou necrose; aumento no recrutamento de neutrófilos; liberação de proteases e oxidantes pelos neutrófilos; aumento da liberação de TNF- α , IL-6 e IL-8 pelos macrófagos alveolares e do epitélio pulmonar; aumento na deposição de fibrina na formação de membrana hialina; comprometimento da capacidade de reabsorção do fluido alveolar (Figura 6) (Matthay *et al.*, 2012). Desta forma, a LPiV pode evoluir para a sua forma mais grave, a SDRA, cuja morbidade e mortalidade permanecem altos nos dias atuais (Jabbari *et al.*, 2013; Letsiou *et al.*, 2015).

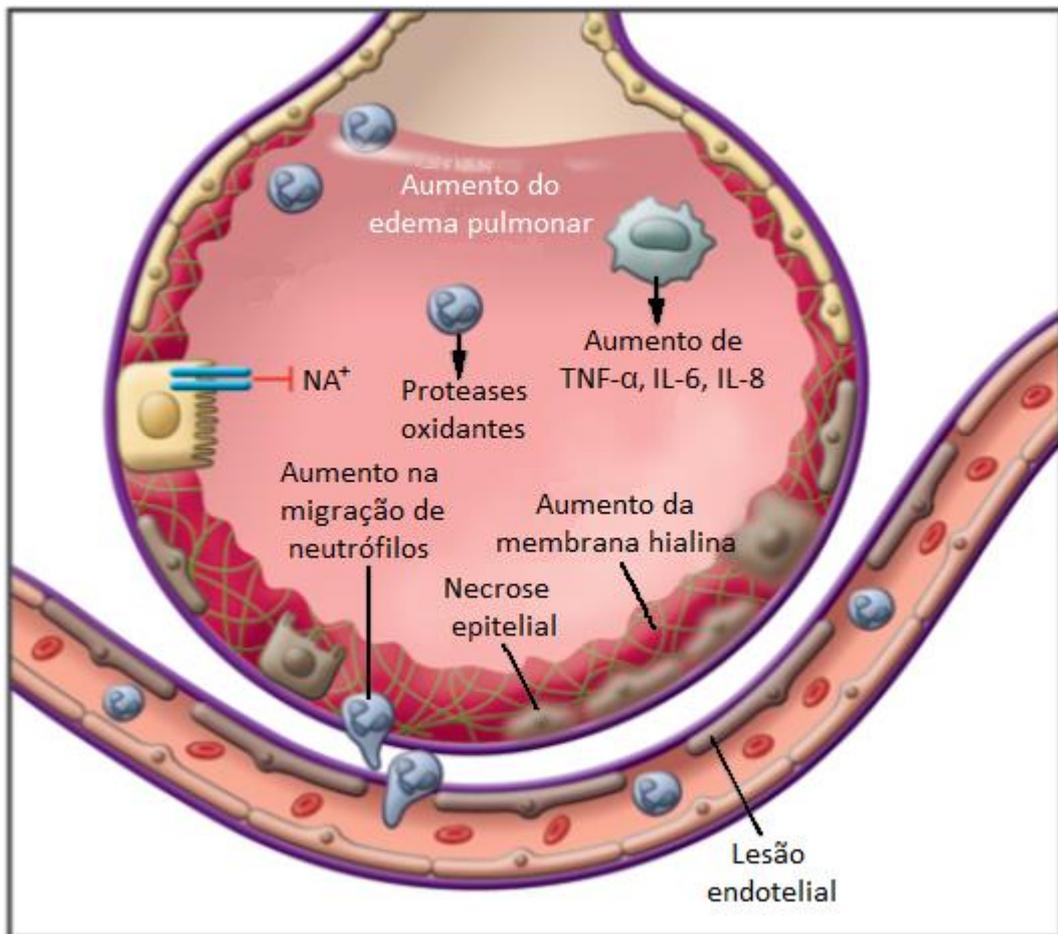


Figura 6: Exacerbação da lesão pulmonar induzida pela ventilação. **Fonte:** Adaptado de Matthay, (2012).

2.3. Desequilíbrio redox

Os radicais livres são átomos ou moléculas que contêm oxigênio e apresentam um elétron não pareado na sua órbita externa. Eles são capazes de reagir com outras moléculas contra as quais colidem, retirando elétrons destas substâncias e modificando suas estruturas moleculares (Júnior *et al.*, 2005). São gerados em sistemas biológicos como um resultado do metabolismo celular normal aeróbico ou em reações anormais estimuladas por algum processo patológico ou xenobiótico (Kehrer e Klotz, 2015). As espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo, são formados intermediários reativos, tais como: os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2), hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 7). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das EROs são neutralizadas com a entrada dos quatro elétrons (Castello *et al.*, 2010).

As EROs são conhecidas por desempenhar um duplo papel em sistemas biológicos (Valko *et al.*, 2006), uma vez que podem ser **prejudiciais**, quando em altas concentrações, atuando como mediadores de danos às biomoléculas, tais como: proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e lipídeos, levando a uma disfunção e morte celular (Valko *et al.*, 2006); ou **benéficas**, desempenhando funções fisiológicas em respostas celulares, como por exemplo, na defesa contra agentes infecciosos e na função dos sistemas de sinalização celular (Poli *et al.*, 2004). As primeiras moléculas biológicas que sofrem dano oxidativo são as proteínas e as suas cadeias laterais, que podem ser carboniladas por compostos carbonilos reativos. Além disso, o dano oxidativo aos lipídeos conduz à formação de produtos, como malondialdeído (MDA) (Battisti *et al.*, 2008).

O efeito das espécies reativas é equilibrado pela ação dos sistemas antioxidantes, formado por substâncias que podem prevenir, reduzir ou reparar o dano induzido por EROs em uma biomolécula alvo (Silva Bezerra *et al.*, 2006; Li, 2016). As defesas

antioxidantes podem atuar em três formas principais: (1) eliminando as EROs já formadas; (2) inibindo a formação das EROs a partir das suas fontes celulares; e (3) removendo ou reparando o dano ou modificações causados pelas EROs. Os antioxidantes enzimáticos mais eficientes envolvem superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de O_2^- em O_2 e H_2O_2 , e a catalase (CAT), que promove de forma eficiente a conversão de H_2O_2 em água e oxigênio molecular (Battisti *et al.*, 2008; Li, 2016). A CAT está localizada intracelularmente, especialmente nos peroxissomos, e funciona de forma eficiente em altas concentrações de H_2O_2 ; quando em baixas concentrações, a forma reduzida de glutathiona (GSH) faz a redução do H_2O_2 . A capacidade do sistema glutathiona para reduzir H_2O_2 depende da relação entre a GSH e a forma oxidada (GSSG), que, por sua vez, depende de dois processos: o transporte da GSSG para fora da célula e a capacidade da enzima glutathiona redutase (GRd) em converter a GSSG em GSH (Tkaczyk e Vízek, 2007; Sarma e Ward, 2011). O sistema não enzimático é composto principalmente pelas vitaminas, polifenóis, flavonoides e carotenoides (Polyakov *et al.*, 2001). A Figura 7 mostra um esquema representativo da formação das espécies reativas de oxigênio (Castello *et al.*, 2010)

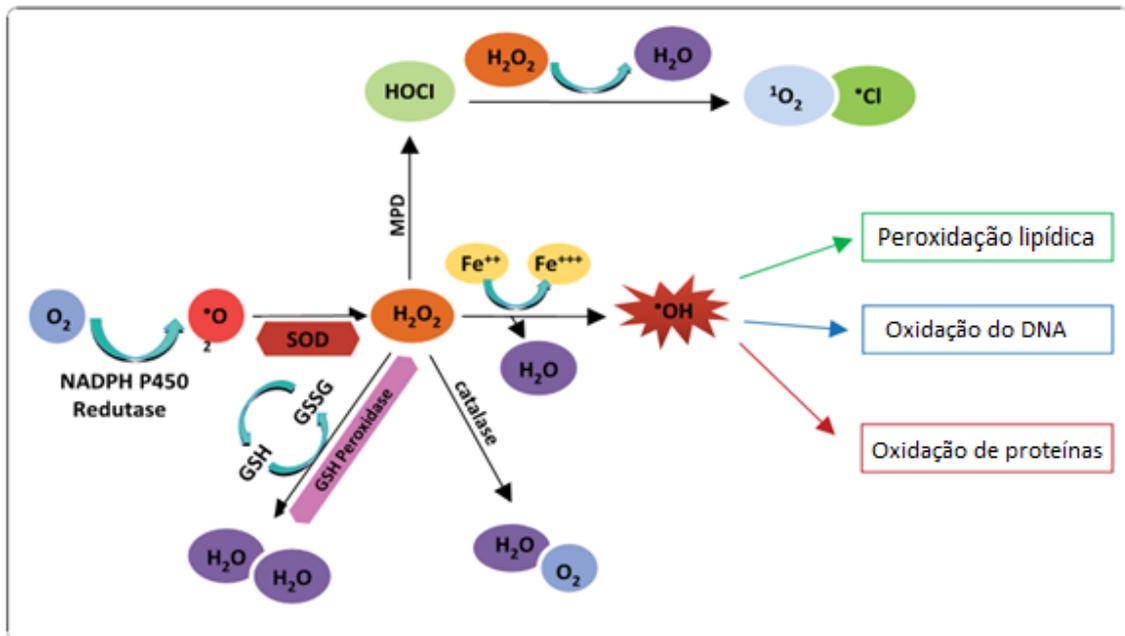


Figura 7: Formação das espécies reativas de oxigênio. **Fonte:** Adaptado de Castello, (2010)

O desequilíbrio redox refere-se a uma condição em que os níveis das EROs sobrecarregam significativamente a capacidade das defesas antioxidantes, conduzindo a potenciais danos (Campos *et al.*, 2014). Pode ser causado por um aumento da formação das EROs, redução da atividade dos antioxidantes ou ambos. Está associado a danos oxidativos às biomoléculas, incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. O desequilíbrio redox pode causar disfunção ou até mesmo a morte celular, contribuindo para processos fisiopatológicos. A Figura 8 ilustra o desequilíbrio redox. Todavia, nem todos os aumentos nos níveis de EROs em um sistema biológico estão associados com lesões. Sob certas circunstâncias, pequenos aumentos transitórios em níveis de EROS podem agir como um mecanismo de sinalização, levando a respostas celulares fisiológicas (Li, 2016).

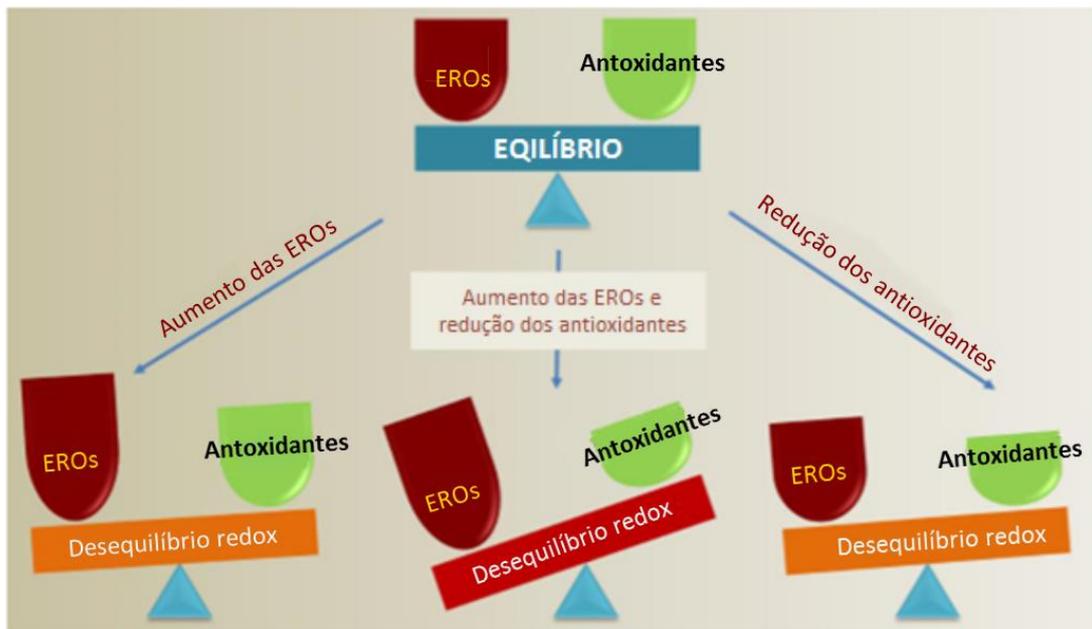


Figura 8: Desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. **Fonte:** Adaptado de Li, (2016)

2.3.1. Desequilíbrio redox e lesão pulmonar

A SDRA é a forma mais grave da lesão pulmonar aguda (LPA), é caracterizada por hipoxemia severa, redução na complacência estática e edema pulmonar não cardiogênico (Villar e Kacmarek, 2012). Jonathan Ciencewickias e colaboradores relataram que as EROs desempenham um papel importante nos danos ao endotélio

vascular pulmonar. A patogênese da SDRA envolve a produção das EROs e níveis reduzidos da defesa antioxidante (Ciencewicki *et al.*, 2008). Pacientes com SDRA apresentam níveis elevados de peróxido de hidrogênio no ar exalado e na urina (Kietzmann *et al.*, 1993). A atividade do sistema de defesa antioxidante, incluindo enzimas como SOD e CAT, bem como a glutatona, a vitamina E e C, foram relacionadas com níveis crescentes de EROs. (Ciencewicki *et al.*, 2008).

O desequilíbrio redox em pacientes com SDRA pode ser causado por infecção ou inflamação extrapulmonar, que podem promover o aumento de todas as EROs e o consumo de antioxidantes, além de concentrações elevadas de oxigênio necessárias para se alcançar uma adequada oxigenação arterial (Tasaka *et al.*, 2008). A administração terapêutica de oxigênio resulta em toxicidade quando a produção das EROs excede à capacidade antioxidante das células (Valença *et al.*, 2007; Nagato *et al.*, 2009; Nagato *et al.*, 2012). Durante o desenvolvimento de LPA / SDRA, a maioria dos oxidantes são gerados como resultado da resposta inflamatória por células fagocíticas, tais como as células mononucleares. Quando os fagócitos são expostos a estímulos apropriados, formam grandes quantidades de superóxido, um precursor importante de outras espécies mais reativas (Tasaka *et al.*, 2008; Lohser e Slinger, 2015).

Os neutrófilos são conhecidos por produzir EROs como parte da sua atividade bactericida, visto que sua membrana citoplasmática contém NADPH oxidase, que gera grande quantidade de O_2^- (Tkaczyk e Vízek, 2007; Zemans *et al.*, 2009; Grommes e Soehnlein, 2011). Em condições fisiológicas, os neutrófilos estão em pequena quantidade nos pulmões e somente após o estímulo, durante uma resposta inflamatória, é que irão migrar para a circulação pulmonar em grandes quantidades. O epitélio alveolar é formado em parte por pneumócitos tipo II. Essas células produzem o surfactante e funcionam como células precursoras para pneumócitos do tipo I, no caso de aumento da destruição do epitélio alveolar (Tkaczyk e Vízek, 2007). Van Klaveren e colaboradores relataram que mesmo as células epiteliais tipo II possuem propriedades enzimáticas para a produção de algumas EROs (Van Klaveren *et al.*, 1997). Células endoteliais pulmonares podem produzir EROS e participar do desequilíbrio redox. Tais células contêm complexo xantina oxidoreductase, que se tornam estimuladas

principalmente após a hipóxia. Além disso, são capazes de liberar quantidades substanciais de O_2^- para o espaço extracelular através dos canais iônicos da membrana (Tkaczyk e Vízek, 2007; Tasaka *et al.*, 2008).

Em resposta a um evento nocivo, como o estiramento cíclico durante a VM, os macrófagos pulmonares tornam-se ativados e regulam positivamente a expressão de moléculas de adesão, o que conduz a adesão de neutrófilos e subsequente transmigração do espaço intravascular para o alveolar. O neutrófilo ativado produz mediadores inflamatórios que incluem as EROs, tais como: OH^- e O_2^- e óxido nítrico (NO), citocinas, quimiocinas, proteases e proteínas (Figura 9). Além da ativação de neutrófilos, outras células que constituem a unidade alveolar também contribuem significativamente para a produção de mediadores inflamatórios. Portanto, os neutrófilos representam a principal fonte de produção das EROs no contexto da lesão pulmonar aguda e SDRA (Chow *et al.*, 2003).

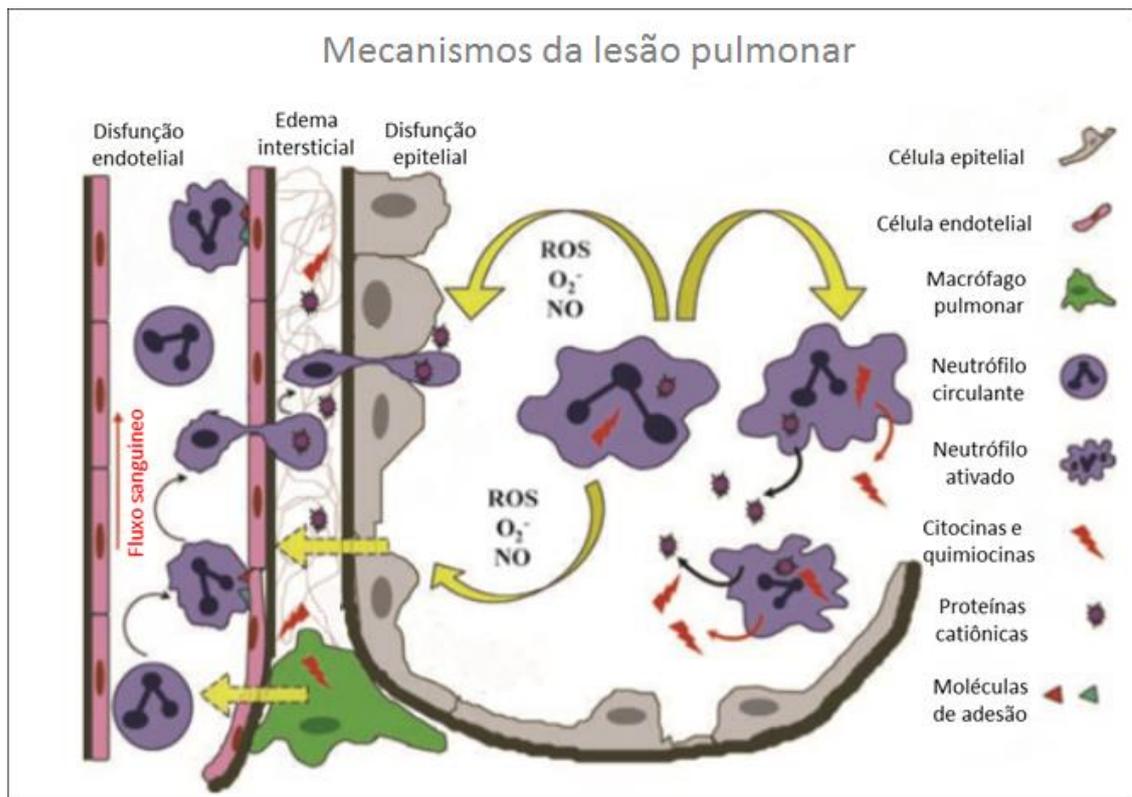


Figura 9: Mecanismos da lesão pulmonar. **Fonte:** Adaptado de Chung-Wai Chow, (2003).

2.4. Citocinas inflamatórias

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular, desempenham um papel crítico como moléculas de sinalização que iniciam, amplificam e perpetuam respostas inflamatórias em uma base local e sistêmica. Tais proteínas são produzidas por células do epitélio alveolar, macrófagos e neutrófilos (Park *et al.*, 2001; Halbertsma *et al.*, 2005; Curley *et al.*, 2016). Após um estímulo, como a VM, há liberação sistêmica de mediadores, incluindo citocinas, que têm efeitos sobre células do endotélio, epitélio, bem como células imunitárias residentes, podendo contribuir para o recrutamento de neutrófilos (Grommes e Soehnlein, 2011).

Dentre as citocinas existe uma família especializada, as quimiocinas, que se diferenciam das demais citocinas por serem as únicas que atuam nos receptores de sinalização intracelular acoplados a proteínas G (Proudfoot, 2002; Puneet *et al.*, 2005; Bhatia *et al.*, 2012) e atuam como potentes mediadores ou reguladores da inflamação, pois promovem o tráfico de leucócitos na homeostase e em processos inflamatórios (Barker *et al.*, 1991; De Paula Costa *et al.*, 2016). As quimiocinas podem ser classificadas como constitutivas (homeostáticas) ou induzíveis (inflamatórias), sendo que as induzíveis contribuem para ALI (Bhatia e Moochhala, 2004; Puneet *et al.*, 2005; Bhatia *et al.*, 2012). Outra classificação é de acordo com o número e localização dos resíduos de cisteína na região N-terminal da molécula, as quais são nomeadas CXC, CC, CX3C, e C (Deshmane *et al.*, 2009). A maioria das quimiocinas da subfamília CC ativa monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos (Charo e Ransohoff, 2006). As células alvo para as quimiocinas CC são eosinófilos, células T, monócitos e também contribuem para o infiltrado de neutrófilos (Bhatia *et al.*, 2012).

As quimiocinas produzem os seus efeitos biológicos através da interação com receptores específicos na superfície da célula das suas células alvo. Os receptores das quimiocinas têm uma estrutura de sete domínios transmembranares e pares de proteína G para a transdução de sinal. Tais receptores são divididos em diferentes famílias, os receptores de quimiocinas CXC (CXCR), CC (CCR), CX3C (CX3CR) e XC (XCR),

que correspondem às quatro subfamílias de quimiocinas descritas previamente (Adams e Lloyd, 1997; Proudfoot, 2002; Bhatia *et al.*, 2012)

A proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1), também conhecida como ligante do receptor de quimiocinas 2 (CCL2), é produzida constitutivamente ou após a indução pelo desequilíbrio redox (Deshmane *et al.*, 2009). A proteína inflamatória de macrófagos-1 (MIP-1) foi assim denominada devido às suas propriedades inflamatórias. Estudos bioquímicos caracterizaram duas proteínas distintas: MIP-1 α e MIP-1 β (Sherry *et al.*, 1988). Com introdução da nova nomenclatura, MIP-1 alfa foi denominada CCL3 e MIP-1beta denominada CCL4 (Zlotnik e Yoshie, 2000). A quimiocina CCL3 tem sido relacionada com recrutamento de leucócitos (Patel *et al.*, 2001). CCL5, também conhecida como RANTES (Células T normais expressas e secretadas, reguladas na ativação), pode ser expressa por uma variedade de tipos de células, incluindo células epiteliais de pulmão e mostrou ser capaz de interagir com os receptores de quimiocinas do tipo CC 1 3 e 5 (CCR1, CCR3 e CCR5). No entanto, o receptor CCR5 mostrou ser altamente expressado em células Th1 e normalmente associada à neutrofilia (Pan *et al.*, 2000), enquanto CCR3 foi detectado somente em células Th2 (Loetscher *et al.*, 1998). Observa-se ainda que CCL5 está relacionada com estimulação de monócitos, basófilos e quimiotaxia para células T (Rot *et al.*, 1992).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Analisar os efeitos oxidantes da PEEP durante a ventilação mecânica sobre a resposta inflamatória pulmonar e sistêmica de ratos Wistar ventilados artificialmente.

3.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC);
- Avaliar Hemograma e Leucograma;
- Realiza contagem total e diferencial de células inflamatórias para o parênquima pulmonar;
- Realizar ensaios bioquímicos para analisar proteínas totais, proteínas carboniladas, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase e a razão glutatona reduzida/glutationa oxidada;
- Avaliar os marcadores inflamatórios CCL2, CCL3 e CCL5;
- Realizar análise estereológica e morfométrica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1. Animais:

Os animais utilizados, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto, receberam cuidados, conforme a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA). Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, com três animais por caixa, mantidos em ambiente com condições de luz, temperatura e umidade controladas; e receberam alimento e água *ad libitum*. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Trabalhos com Animais de Experimentação (CEUA) da UFOP (Protocolo n ° 2015/10, que consta no anexo I desta dissertação).

4.2. Grupos experimentais:

Dezoito ratos Wistar machos, com 10 a 12 semanas de idade, massa corporal média de 308 g, divididos de forma aleatória em três grupos de seis animais cada, sendo que não houve diferença significativa no peso dos animais entre os grupos:

Grupo Controle (GC): Animais mantidos em ventilação espontânea;

Grupo PEEP (GP): Animais submetidos à ventilação mecânica com PEEP de 5 cmH₂O;

Grupo ZEEP (GZ): Animais submetidos à ventilação mecânica sem uso de PEEP.

4.3. Monitorização cardiovascular:

4.3.1. Confeção das cânulas:

Cânulas foram confeccionadas a partir de 4 cm de tubos de polietileno PE 10, polimerizados por aquecimento a 17 cm de tubos de polietileno PE 50. O interior das cânulas foi preenchido com uma solução salina heparinizada e a extremidade livre de PE 50 foi fechada com um oclisor metálico.

4.3.2. Canulação da artéria femoral:

Para registro dos parâmetros cardiovasculares, todos os animais foram colocados em uma mesa, sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados com esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos em abdução a 90° em relação ao corpo, e os membros inferiores estendidos em diagonal. Em seguida, foram sedados (tiopental sódico, 50 mg/kg, e fentanil 2,25 µg/kg i.m.), submetidos a uma pequena incisão na região inguinal direita para separar a musculatura para localização do feixe vaso-nervoso femoral. Foi então realizado um corte na artéria femoral direita, utilizando-se uma pinça oftálmica e a cânula introduzida na artéria femoral direita, esta foi fixada com fio cirúrgico (Mesquita *et al.*, 2016).

4.3.3. Registro direto da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC):

A avaliação da PAM e a FC foram realizadas através do registro direto da pressão arterial nos animais anestesiados, acoplados ao sistema computadorizado de aquisição de dados (Powerlab 4/30). A PAM foi monitorada por um transdutor de pressão modelo Gould conectado a um amplificador (ML221 Bridge Amp). A pressão arterial pulsátil (PAP) e 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 (PC). 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 derivadas em tempo real a 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 (Silva *et al.*, 2016).

4.4. Ventilação Mecânica:

4.4.1. Traqueostomia:

Os animais dos grupos GP e GZ, após a canulação, foram submetidos a uma incisão mediana na região cervical anterior. A musculatura foi divulsionada com auxílio de uma pinça hemostática, a traqueia exposta e realizado o afastamento dos anéis cartilagosos. Em seguida, uma cânula de polietileno (PE 90) foi introduzida na traqueia e o animal foi conectado ao ventilador mecânico *Inspira Advanced Safety Ventilator* (Harvard Apparatus) (Farias *et al.*, 2005).

4.4.2. Parâmetros ventilatórios:

Os animais dos grupos GP e GZ, após serem traqueostomizados, foram conectados ao ventilador mecânico por um período de 60 minutos e ventilados no modo controlado a volume com um VC de 7ml/kg, FR de 80 incursões respiratórias por minuto IRPM, relação inspiração, expiração de 1:2, FiO₂ 0,21 e PEEP de 0 ou 5 cmH₂O de acordo com o grupo a que fora designado. O sistema de PEEP utilizado foi o selo d'água no qual o ramo expiratório do circuito ficou imerso em um recipiente com água, onde a profundidade em que o circuito foi posicionado correspondia ao valor da PEEP (Fagevik Olsén *et al.*, 2015)

Logo após serem conectados ao ventilador mecânico, os animais foram curarizados através de injeção intravenosa (i.v.) de brometo de pancurônio (2mg/Kg). Após cinco minutos de adaptação à VM e aos sessenta minutos de ventilação, foi realizada uma pausa inspiratória de 5 segundos para mensuração da PPL. A Complacência estática do sistema respiratório foi calculada da seguinte forma (Perel e Stock, 1994; Nichols e Haranath, 2007):

$$Cst \frac{VC}{Ppl - PEEP}$$

A resistência da via aérea foi calculada através da fórmula (Nichols e Haranath, 2007):

$$Rva = \frac{P_{pi} - P_{pl}}{Fluxo}$$

Durante os sessenta minutos de ventilação, foram monitoradas a SpO₂, a P_{pi}, FC, PAM e temperatura corporal, que foi mantida em 37°. Foi realizada dose de manutenção anestésica através de bolus de fentanil (1µg/Kg), tiopental sódico (20mg/Kg) e do bloqueador neuromuscular (1mg/Kg) (Sun *et al.*, 2015).

4.5. Coleta do sangue

Ao final de sessenta minutos de ventilação (grupos GP e GZ) ou monitorização hemodinâmica (grupo controle), o sangue foi coletado através de punção cardíaca, na qual duas alíquotas sanguíneas de cada animal foram coletadas em tubos de polipropileno com 15 µL de anticoagulante (heparina) para obtenção do plasma. A primeira alíquota, com 200 µL de sangue, foi encaminhada ao Laboratório de Imunopatologia (LIMP) - UFOP para a realização do Hemograma e Leucograma. A segunda alíquota, com aproximadamente 800 µL, foi centrifugada a 10.000 RPM por 15 minutos e o sobrenadante foi retirado e armazenado em um freezer (-80°C) para a realização de ensaio imunoenzimático. Após coleta do sangue, os animais foram eutanasiados por exsanguinação. (Campos *et al.*, 2015).

4.5.1. Esfregaço sanguíneo

O sangue (2 µL) foi depositado (pipeta automática) em uma das extremidades de uma lâmina histológica estéril. Com uma lâmina extensora a 45°, foi realizado um movimento firme e uniforme, deslizando-a sobre a lâmina histológica, de maneira que o sangue fosse espalhado, formando uma fina camada ao longo da lâmina histológica. As lâminas foram coradas com o *kit Panóptico Rápido*, através de 5 banhos de imersão em cada uma das três soluções distintas: metanol, eosina e azul de metileno. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso dos corantes e secadas em temperatura ambiente. Foram contados um total de 100 leucócitos por lâmina, os quais foram diferenciados entre monócitos, linfócitos e neutrófilos, através da coloração, morfologia nuclear e citoplasmática e presença ou

ausência de grânulos citoplasmáticos (Campos *et al.*, 2014).

4.6. Coleta do Lavado Broncoalveolar (LBA)

Imediatamente após a eutanásia, o tórax de cada animal foi aberto, o brônquio principal esquerdo foi clampeado, a traqueia canulada e o pulmão direito foi lavado com 3 ml de solução salina (3 x 1000 µL). As amostras foram mantidas em gelo até o final do procedimento, a fim de evitar lise celular. Para a contagem total de leucócitos no LBA, foi utilizada a câmara de Neubauer, onde foi colocado 0,1 mL do LBA e 0,3 mL de corante azul de tripano 0,2%, obtendo assim uma diluição de 1/4. Logo após, os leucócitos foram contados nos quatro quadrantes encontrados nos extremos da câmara. Para a contagem diferencial de células no LBA, 250 µL das amostras foram citocentrifugadas em uma centrífuga cytospin (Shandon, Waltham, MA, EUA) na qual foram colocadas lâminas, e centrifugadas a 1.000 RPM durante 1 minuto. Após a obtenção das lâminas, estas foram coradas com o *kit Panótico Rápido*, através de 5 banhos de imersão em cada uma das três soluções distintas: metanol, eosina e azul de metileno. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de corantes e secadas em temperatura ambiente. Foram contadas 100 células por lâmina, as quais foram diferenciadas entre macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Campos *et al.*, 2013).

4.7. Processamento Tecidual:

Após a realização do lavado broncoalveolar, o ventrículo direito foi perfundido com solução salina. O brônquio principal direito foi clampeado para que fosse instilada apenas no pulmão esquerdo, via traqueia, formalina tamponada 4% (pH 7,2) a uma pressão de 25 cmH₂O por 2 minutos. O pulmão esquerdo foi então removido e imerso em solução fixadora por 48 horas. Em seguida, o material foi processado da seguinte forma: banho em água corrente por 30 minutos; banho em álcool a 70% e 90% por 1 h cada etapa; 2 banhos em álcool a 100% por 1 h cada; 2 banhos de xilol de 1 h cada; 2 banhos em parafina de 1 h cada e inclusão em parafina. Após processamento de rotina e inclusão em parafina, foram feitos cortes seriados com quatro micrômetros de

espessura, os quais foram corados em hematoxilina-eosina (HE) para a análise morfológica (Campos *et al.*, 2013).

4.7.1. Análises Morfológicas e Estereológicas:

A análise da densidade de volume do septo alveolar (V_{vsa}) e do espaço aéreo alveolar (V_{va}) foi realizada em um sistema-teste composto por 16 pontos e em uma área-teste conhecida (Held *et al.*, 2001), onde a linha proibida foi considerada como delimitação, a fim de evitar uma superestimação no número de estruturas. O sistema teste foi acoplado a um monitor ligado a um microscópio. O número de pontos (PP) que atingiram os septos alveolares e os espaços aéreos alveolares foram avaliados de acordo com o número total de pontos de um sistema teste (Pt). Temos, então, $V_v = Pp/Pt$. Para se obter amostras uniformes e proporcionais do pulmão, foram analisados aleatoriamente 16 campos e um sistema ciclóide de ensaio sobreposto a tela do monitor. O volume de referência foi estimado pela contagem de pontos de utilização dos sistemas de ponto de teste (PT). Uma área total de $1,94 \text{ mm}^2$ foi analisada para determinar as densidades de volumes dos septos alveolares e dos espaços alveolares em cortes corados em hematoxilina e eosina (HE), respectivamente. Análise da área alveolar foi realizada através do programa ImageJ® (National Institute of Health, NIH, Maryland, USA) (Campos *et al.*, 2015).

4.8. Homogeneizado Pulmonar:

Em seguida à retirada do pulmão esquerdo para histologia, o pulmão direito foi imediatamente removido e armazenado em gelo picado em tubos devidamente etiquetados. Depois, uma alíquota referente a 0,1 g do pulmão direito foi homogeneizado (Homogeneizador Novatécnica mod. NT136, Piracicaba, Brasil) em 1,5 ml de tampão fosfato de potássio pH 7,5 e centrifugado a 10.000 RPM, 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer para posteriores análises bioquímicas (Murta *et al.*, 2016).

4.8.1. Ensaio Imunoenzimático do Homogeneizado Pulmonar:

As análises teciduais de CCL 2, CCL 3 e CCL5 foram realizadas sob um protocolo no qual 10 mg de tecido pulmonar foi homogeneizado com 1 mL de tampão fosfato (PBS). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, o pellet foi descartado e o conteúdo final foi coletado e armazenado a -80 °C para posterior análise por meio do método de ELISA. Para estes ensaios, foram utilizados kits, sendo todos os anticorpos e reagentes reconstituídos e aliquotados de acordo com as orientações dos fabricantes. Em placas de 96 poços, foram adicionados 100 µl de anticorpo monoclonal contra o peptídeo (anticorpo de captura), reconstituído em PBS, sendo estas placas incubadas por 12 horas a temperatura ambiente. Os anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS-*Tween* (PBS adicionado de 0,05% de *Tween*20) e as placas foram bloqueadas com 100 µl/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, as placas foram novamente lavadas. As amostras foram aplicadas em um volume de 100 µl para cada poço. Paralelamente, a proteína investigada foi diluída em várias concentrações para o estabelecimento da curva padrão 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% foi adicionado 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). 5mL do cromógeno foi adicionado a 5 mL de água oxigenada (H₂O₂) fornecida pelo mesmo fabricante (*Color reagent A* - R&D Systems, Minneapolis, USA). 100 µL dessa solução foram adicionados em cada um dos poços e, após 20 minutos de incubação em ausência de luz e temperatura ambiente, a reação foi bloqueada adicionando-se 100 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 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 H₂SO₄ para o bloqueio das reações. A quantificação das citocinas presentes nas amostras foi determinada, baseada na densidade óptica obtida com a curva

padrão dos peptídeos e analisada pelo software SOFTmax PRO 4.0 (Penitente *et al.*, 2015).

4.8.2. Biomarcadores do Desequilíbrio Redox e Defesa Antioxidante

4.8.2.1. Proteínas Totais:

A dosagem de proteínas foi realizada nas amostras do homogeneizado tecidual pelo Método de Bradford. 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 465 nm para 595 nm, medida através do leitor de ELISA (Bio-Rad mod. 550, Hercules, EUA). Esta concentração foi representada em mg/mL (Bradford, 1976).

4.8.2.2. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica foi determinada por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando o método de Buege e colaboradores (Buege e Aust, 1978). A concentração de TBARS é baseada na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídios oxidados. Para a realização da dosagem, fragmentos de 100 mg do pulmão, foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato (pH 7,4) e, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 10.000 RPM a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. Em um tubo, foram adicionados 500 µL de homogeneizado, 250 µL de ácido tricloroacético (TCA), 28% p/v dissolvido em HCL (0,25 M), 250µL de TBA, 1% dissolvido em ácido acético (0,25 M) e 125 µL de hidroxibutiltolueno (BHT 125 mM) dissolvidos em etanol. Em seguida, o tubo foi levado ao vórtex e colocado em banho-maria a 95 °C por 15 minutos. Após serem resfriados em banho de gelo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 RPM a 4°C, e a absorvância do sobrenadante determinada a 535 nm. Água destilada foi utilizada como padrão. A concentração de TBARS foi calculada através do coeficiente de extinção molar do malondialdeído (MDA) ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). De acordo com a lei de Lambert Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$), onde: A = absorvância; ϵ = coeficiente de extinção molar em unidades de $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$; b = caminho

óptico; c = concentração da enzima expressa em mol L⁻¹. Esta concentração foi representada em nM/mg de proteína (Campos *et al.*, 2013).

4.8.2.3. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Atividade da SOD foi medida nos tecidos de acordo com o método de Larcombe (Larcombe *et al.*, 2011) que se baseia na capacidade da SOD em inibir a autooxidação do pirogalol. Os reagentes de trabalho utilizados foram: KH₂PO₄, Na₂HPO₄, Pirogalol, MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difenilterazolio) e dimetilsulfóxido (DMSO).

Para a realização da dosagem, fragmentos de 100 mg do tecido foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato (50 mM), pH 7,0 e, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 12.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. A confecção das dosagens nas amostras usando placa de ELISA seguiu a sequência de adições de reagentes, conforme o quadro 1.

Quadro 1. Reagentes utilizados para mensurar a atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

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

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

4.8.2.4. Atividade da Catalase

A determinação da atividade da enzima CAT é baseada na sua capacidade de converter H_2O_2 em água e O_2 molecular, conforme descrito por Aebi (Aebi, 1984). Para a preparação da amostra biológica, 100 mg do pulmão foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) e, em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 RPM a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno, foi adicionado 50 μL de tampão fosfato 0,1 mM (pH 7,2) e 40 μL de água destilada, o qual foi mantido em banho-maria a 30 °C por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 10 μL das amostras e 900 μL de H_2O_2 (10 mM). As absorbâncias foram determinadas no espectrofotômetro a 240 nm, exatamente a cada minuto, durante 3 minutos. A água destilada é utilizada como branco. A atividade da CAT foi calculada segundo a lei de Lambert Beer citada anteriormente. A absorbância utilizada nessa expressão é o delta obtido da primeira e da última absorbância lida (absorbância final - absorbância inicial). O coeficiente de extinção molar utilizado foi o do H_2O_2 ($39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Esta concentração foi representada em U/mgptn. Uma unidade de catalase é equivalente a hidrólise de 1 μmol de H_2O_2 por minuto.

4.8.2.5. Proteína Carbonilada

A reação das EROs com a porção proteica da membrana celular pode levar à oxidação desta com a conseqüente formação de derivados carbonílicos. Assim, para a determinação da concentração de proteína carbonilada no homogeneizado pulmonar, foi utilizado o método descrito por Levine (Levine *et al.*, 1994). Cada amostra foi precipitada com TCA (ácido tricloroacético) a 10%. Após a centrifugação, o precipitado foi tratado com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), incubado no escuro em temperatura ambiente por uma hora e passado no vórtex a cada 15 minutos. Logo após foi administrado TCA 10% seguido de centrifugação, as amostras foram lavadas duas vezes com composto etanol/acetato de etila (1:1) e dissolvidas em 1mL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 6% seguido por centrifugação. Os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro a 370 nm. O conteúdo de proteína carbonilada foi calculado, usando o coeficiente de extinção molar de $22\ 000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e expresso por nmol de proteína

carbonilada formada por mg de proteína. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína.

4.8.2.6. Concentração da glutathiona

A Glutathiona total (GSH + GSSG) foi determinada enzimaticamente de acordo com Akerboom e colaboradores (Hauber *et al.*, 2010). Esse ensaio utilizou um método cinético fundamentado na redução do ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB). A GSH presente na amostra reage com DTNB, produzindo o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e GSSG. Para o preparo dos reagentes de estoque, foram utilizados: solução de ácido sulfosalicílico (SSA) 5%; tampão fosfato (500 mM), contendo 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); solução padrão, estoque de glutathiona (0,3 mg de glutathiona reduzida em 0,1 mL de água destilada); solução de estoque de DTNB (8 mg de DTNB foram diluídos em 5,33 mL de DMSO) o que resultou em uma solução com 1,5 mg/mL e estoque de NADPH (40 mg/mL). A amostra biológica foi preparada com 100 mg do pulmão homogeneizado em 1 mL de SSA 5% e, em seguida, centrifugada a 10.000 RPM, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. Os reagentes utilizados foram: solução de enzima diluída (15,2 µL de glutathiona redutase (100 unidades/mL) diluída em 250 µL de tampão fosfato 100 mM); solução de NADPH de trabalho (da solução de estoque de NADPH preparada são retirados 30 µL para 7,5 mL de tampão fosfato 100 mM); mistura de trabalho (8 mL de tampão 100 mM, 228 µL da solução de enzimas diluída e 228 µL de DNPH solução de estoque); solução padrão de glutathiona – preparada para a curva padrão (foi diluído 10 µL de solução estoque de glutathiona padrão com 2 mL de SSA 5%). Para a confecção da curva padrão e das dosagens nas amostras foi utilizada placa de Elisa, seguindo a sequência de adições de reagentes, conforme mostradas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Reagentes utilizados para obtenção da curva padrão.

Poço	1	2	3	4	5
[GSH] μM	50	25	12,5	6,25	3,125
Solução de GSH (μL)	50	25 (tubo 1)	25 (tubo 2)	25 (tubo 3)	25 (tubo 4)
SSA 5% (μL)	-	25	25	25	25
nmoles de GSH em 10 μL	0,5	0,25	0,125	0,062	0,0312

Tabela 2: Reagentes utilizados para a dosagem.

Poço	Volume da amostra	Tampão	MTT (1,25 mM)	Pirogalol (100 μM)
Branco	-	10 μl	150 μl	50 μl
Padrão	10 μl	-	150 μl	50 μl
Amostra	10 μl	-	150 μl	50 μl

As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foi adicionado NADPH às mesmas com o cronômetro sendo iniciado. As absorbâncias foram lidas durante 5 minutos, a cada minuto, no leitor de ELISA a 412 nm. As absorbâncias de diluições seriadas de uma solução padrão de glutationa reduzida foram determinadas e a GSSG, já presente na amostra, foi reduzida a GSH pela presença de NADPH (chamado de método enzimático), medido após derivação da glutationa total com acréscimo de 2-vinilpiridina (2-VP). Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta [Concentração = $a \cdot (\text{delta das absorbâncias}) +$

b]. Essa equação foi utilizada para determinar a concentração em nmols de glutathione total em 10 µl de amostra, e esse valor extrapolado para 1 mL de amostra. O índice de estresse oxidativo foi calculado pela razão GSH/GSSG. Estas concentrações foram representadas em nmol/mL (Murta *et al.*, 2016).

4.9. Análise Estatística

Os dados foram testados quanto a sua normalidade de distribuição através do teste Kolmogorov-Smirnov e foram expressos em média \pm erro padrão da média. Para os dados paramétricos, foram utilizadas as análises de variância univariada (ANOVA one-way) seguidas pelo pós-teste de Tukey e o teste t de Student. Todas as análises foram realizadas, utilizando o software GraphPadPrism, versão 5.00 para Windows 7, GraphPad Software (San Diego, CA, USA) e foi considerada como diferença significativa o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Monitorização Hemodinâmica, da Oxigenação e da Mecânica Ventilatória

Durante todo o período da VM, os parâmetros hemodinâmicos dos animais foram monitorados. Os resultados da frequência cardíaca, pressão arterial média, saturação de oxigênio no sangue, complacência estática pulmonar e a resistência da via aérea, no início e ao final do processo de ventilação mecânica, foram dispostos na Tabela 3.

Tabela 3: Monitorização Hemodinâmica, da Oxigenação e da Mecânica Ventilatória

Variável	Inicial	Final	<i>p</i>	Inicial	Final	<i>p</i>
	GP	GP		GZ	GZ	
FC (bpm)	401,5 ± 6,3	373,1 ± 16,2	> 0,05	411,9 ± 6,8	383,4 ± 12,3	> 0,05
PAM (mmHg)	115,1 ± 8,8	98,5 ± 7,4	> 0,05	117,6 ± 11,1	97,8 ± 4,1	> 0,05
SpO ₂ (%)	93,7 ± 0,5	94,5 ± 1,2	> 0,05	91,6 ± 1,5	92,4 ± 1,5	> 0,05
Cest (mL/cm H ₂ O)	0,29 ± 0,1	0,25 ± 0,1	> 0,05	0,25 ± 0,0	0,24 ± 0,0	> 0,05
Rva (cmH ₂ O/ml/s)	1,98 ± 0,9	1,34 ± 0,2	> 0,05	1,34 ± 0,3	1,31 ± 0,3	> 0,05

FC: Frequência cardíaca, PAM: Pressão arterial média, SpO₂: Saturação de oxigênio no sangue, Cest: Complacência estática do sistema respiratório. Rva: Resistência da via aérea. Os dados estão expressos como média ± EPM e foram analisados pelo teste T pareado ($p < 0,05$).

Quando analisados os dados obtidos referentes à função hemodinâmica e mecânica ventilatória, podemos observar que não houve alteração significativa desses parâmetros no início e no final da ventilação, como mostrado na Tabela 3. Logo, não houve instabilidade hemodinâmica nem alteração da mecânica ventilatória dos animais dos grupos GP e GZ durante o período de VM. Nessa mesma linha, comparamos os parâmetros iniciais e finais entre os grupos GP e GZ, como mostrado na Tabela 4. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos GP e GZ.

Tabela 4: Comparação dos parâmetros fisiológicos durante a VM entre os grupos.

Variável	Inicial		<i>p</i>	Final		<i>p</i>
	GP	GZ		GP	GZ	
FC (bpm)	401,5 ± 6,3	411,9 ± 6,8	> 0,05	373,1 ± 16,2	383,4 ± 12,3	> 0,05
PAM (mmHg)	115,1 ± 8,8	117,6 ± 11,1	> 0,05	98,5 ± 7,4	97,8 ± 4,1	> 0,05
SpO ₂ (%)	93,7 ± 0,5	91,6 ± 1,5	> 0,05	94,5 ± 1,2	92,4 ± 1,5	> 0,05
Cest (mL/cm H ₂ O)	0,29 ± 0,1	0,25 ± 0,0	> 0,05	0,25 ± 0,1	0,24 ± 0,0	> 0,05
Rva (cmH ₂ O/L/S)	1,98 ± 0,9	1,34 ± 0,3	> 0,05	1,34 ± 0,2	1,31 ± 0,3	> 0,05

FC: Frequência cardíaca, PAM: Pressão arterial média, SpO₂: Saturação de oxigênio no sangue, Cest: Complacência estática do sistema respiratório, Rva: Resistência da via aérea. Os dados estão expressos como média ± EPM e foram analisados pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

5.2. Parâmetros Hematológicos

Os parâmetros hematológicos dos grupos experimentais foram obtidos e quantificados os valores de Eritrócitos, Hematócritos e Hemoglobina dos grupos de estudo. Os valores foram apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros hematológicos dos grupos experimentais.

	GC	GP	GZ	<i>p</i>
Eritrócito ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	5,9 ± 0,7	7,9 ± 0,2 ^a	7,3 ± 0,4	< 0,05
Hematócrito (%)	30,0 ± 3,8	39,7 ± 2,5	39,2 ± 2,8	> 0,05
Hemoglobina (g/dL)	15,1 ± 0,4	16,2 ± 0,6	14,6 ± 0,9	> 0,05

(a) Diferença significativa quando comparado ao GC. Os dados estão expressos como média ± EPM e foram analisados pela análise de variância One Way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey ($p < 0,05$).

De acordo com a Tabela 5, os animais do grupo GP apresentaram maiores níveis séricos de eritrócitos quando comparado ao grupo GC. As demais variáveis não apresentaram diferenças significativas. Para realizar o monitoramento e caracterização de células do sangue, foi realizada a contagem total e diferencial das células. Conforme mostrado na Tabela 6, não houve alteração na quantidade de leucócitos totais,

monócitos e linfócitos presentes no sangue dos grupos GP e GZ quando comparado ao grupo GC. A ventilação mecânica no grupo GP promoveu um aumento significativo do número de neutrófilos observado em relação ao grupo experimental GC.

Tabela 6: Leucograma mostrando a contagem das células nos grupos experimentais.

Variáveis	GC	GP	GZ	P
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$3,5 \pm 0,8$	$6,5 \pm 0,9$	$4,3 \pm 1,1$	$> 0,05$
Monócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$0,1 \pm 0,0$	$0,5 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$	$> 0,05$
Neutrófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$0,3 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2^a$	$1,2 \pm 0,4$	$< 0,05$
Linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$1,9 \pm 0,9$	$4,3 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,8$	$> 0,05$

(a) Diferença significativa quando comparado ao GC. Os dados estão expressos como média \pm EPM e foram analisados pela análise de variância One Way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey ($p < 0,05$).

Com o objetivo de analisar o recrutamento de células inflamatórias nos pulmões dos animais submetidos à VM, foram determinadas as quantidades de leucócitos totais e diferenciais (macrófagos, linfócitos e neutrófilos) presentes no LBA (Tabela 7). Observamos um aumento do número de leucócitos totais no grupo GP quando comparado aos grupos GC e GZ, e um maior recrutamento de neutrófilos no grupo GP quando comparado ao GC.

Tabela 7: Influxo de células no lavado broncoalveolar dos grupos experimentais.

	GC	GP	GZ	p
Leucócitos totais ($\times 10^3/\text{ml}$)	$206,0 \pm 20,6$	$328,0 \pm 38,4^{a,c}$	$206,0 \pm 23,15$	$< 0,05$
Macrófagos ($\times 10^3/\text{ml}$)	$174,5 \pm 16,2$	$202,0 \pm 61,3$	$168,1 \pm 25,1$	$> 0,05$
Neutrófilos ($\times 10^3/\text{ml}$)	$5,8 \pm 5,3$	$92,3 \pm 36,3^a$	$12,5 \pm 3,6$	$< 0,05$
Linfócitos ($\times 10^3/\text{ml}$)	$25,66 \pm 70,9$	$33,6 \pm 5,5$	$25,4 \pm 3,6$	$> 0,05$

(a) Diferença significativa quando comparado ao GC; (c) Diferença significativa entre o grupo GP quando comparado ao GZ. Os dados estão expressos como média \pm EPM e foram analisados pela análise de variância One Way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey ($p < 0,05$).

5.3. Análises imunoenzimáticas

As análises das citocinas inflamatórias foram realizadas no homogeneizado pulmonar para avaliar a resposta inflamatória nos pulmões. Os resultados demonstraram que a concentração de CCL3 foi maior no grupo GP em relação aos demais grupos, e a concentração de CCL 5 foi maior no grupo GP quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença nos níveis de CCL2 entre os grupos estudados (Tabela 8).

Tabela 8: Análises imunoenzimáticas no homogeneizado pulmonar.

	CG	GP	GZ	p
CCL2 (µg/ml)	1,51 ± 0,14	1,45 ± 0,03	1,46 ± 0,07	> 0,05
CCL3 (µg/ml)	0,13 ± 0,04	0,27 ± 0,04 ^{a,c}	0,11 ± 0,03	< 0,05
CCL5 (µg/ml)	1,18 ± 0,09	1,67 ± 0,15 ^a	1,52 ± 0,13	< 0,05

(a) Diferença significativa quando comparado ao GC; (c) Diferença significativa entre o grupo GP quando comparado ao GZ. Os dados estão expressos como média ± EPM e foram analisados pela análise de variância One Way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey (p<0,05).

5.4. Desequilíbrio Redox

Por meio da formação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e da oxidação de proteínas, é possível obter o índice de dano oxidativo resultante da exposição dos grupos experimentais submetidos ao processo de VM. Esse estudo mostrou que a peroxidação lipídica foi maior no grupo GP quando comparado aos grupos GC e GZ. Da mesma forma, houve um aumento da oxidação proteica no grupo GP quando comparado aos grupos GC e GZ. A atividade das enzimas SOD e CAT no parênquima pulmonar foi maior no grupo GP em relação ao GC e GZ e a razão GSH/GSSG foi menor no grupo GP quando comparada ao grupo GC (Tabela 9).

Tabela 9: Avaliações do estresse e danos causados pela oxidação no parênquima pulmonar dos grupos experimentais.

	GC	GP	GZ	<i>p</i>
TBARS (nM/mg ptn)	1,47 ± 0,09	5,32 ± 0,66 ^{a,c}	1,47 ± 0,26	< 0,05
PTN CARB (nmol/mg ptn)	19,76 ± 2,58	37,32 ± 6,69 ^{a,c}	16,41 ± 2,21	< 0,05
SOD (U/mgptn)	34,84 ± 2,27	128,9 ± 11,16 ^{a,c}	56,98 ± 7,46	< 0,05
CAT (U/mgptn)	4,14 ± 0,04	15,47 ± 2,23 ^{a,c}	3,78 ± 0,53	< 0,05
GSH/GSSG	1,32 ± 0,14	0,52 ± 0,17 ^a	0,69 ± 0,24	< 0,05

(a) Diferença significativa quando comparado ao GC; (c) Diferença significativa entre o grupo GP quando comparado ao GZ. Os dados estão expressos como média ± EPM e foram analisados pela análise de variância One Way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey ($p < 0,05$).

5.5. Estereologia

A densidade de volume do septo alveolar e a densidade de volume de espaço aéreo alveolar dos grupos experimentais foram analisadas. Não verificamos variação significativa entre a densidade de volume do septo alveolar e da densidade de volume de espaço aéreo entre os grupos, como mostrado nas Figuras 10 e 11.

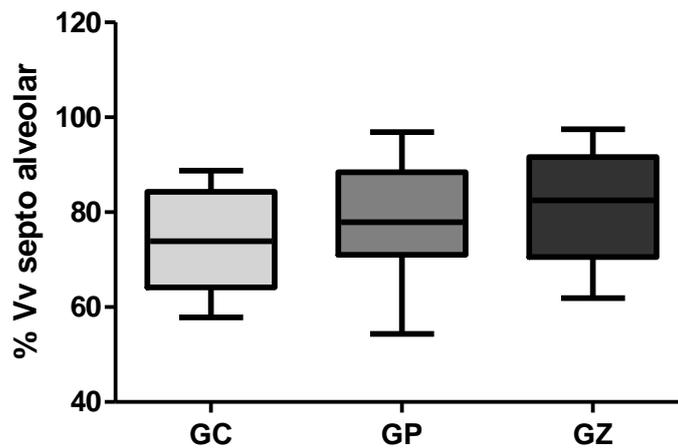


Figura 10: Densidade de volume de septo alveolar. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão e foram analisados pela análise de variância One Way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey ($p < 0,05$).

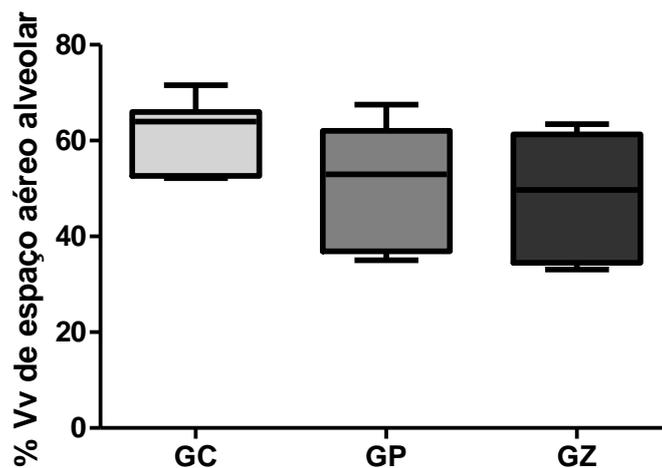


Figura 11: Densidade de volume de espaço aéreo alveolar. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão e foram analisados pela análise de variância One Way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey ($p < 0,05$).

Foi realizada análise de área alveolar e os resultados mostraram que houve um aumento significativo da área alveolar do grupo GP em relação aos grupos GC e GZ (Figuras 12 e 13).

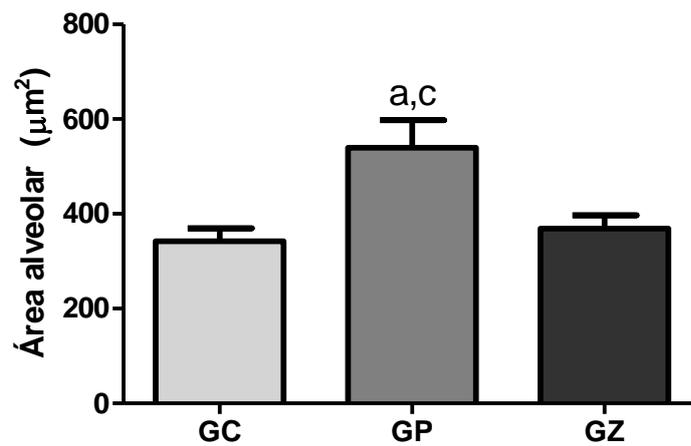


Figura 12: Área alveolar. A letra a representa diferença significativa em relação ao grupo GC, a letra c representa diferença significativa em relação ao grupo GZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão e foram analisados pela análise de variância One Way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey ($p < 0,05$).

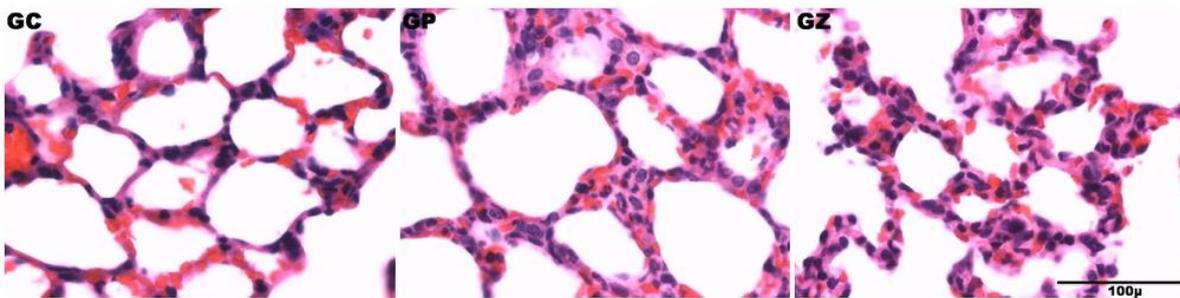


Figura 13: Fotomicrografias de cortes do pulmão corados com H&E. Aumento de 40x. Análise de área alveolar.

6. DISCUSSÃO:

Neste trabalho, avaliamos os efeitos da ventilação mecânica com e sem o uso da PEEP na resposta inflamatória e o desequilíbrio redox em pulmões saudáveis de ratos Wistar, através da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e a razão GSH/GSSG; além da oxidação de proteínas, formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no homogeneizado pulmonar, contagem total e diferencial de células inflamatórias no LBA e no sangue, a expressão de CCL2, CCL3 e CCL5, a densidade de volume (Vv) do septo alveolar, Vv do espaço aéreo alveolar e da área alveolar.

A VM é amplamente utilizada com o objetivo de otimizar a troca gasosa, porém pode desencadear ou intensificar uma lesão pulmonar pré-existente. Além de induzir lesões em nível tecidual, como: barotrauma, volutrauma e atelectrauma, a VM também pode induzir lesões em nível celular (Akinci *et al.*, 2005; Ngiam e Kavanagh, 2012). Prost e colaboradores sugeriram que as forças atuantes no parênquima pulmonar durante a VM são superiores às forças aplicadas na via aérea (De Prost *et al.*, 2011). A ação de forças mecânicas nos componentes da arquitetura pulmonar resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias, bem como no recrutamento de leucócitos e o início de processos inflamatórios locais (De Prost *et al.*, 2011; Kuchnicka e Maciejewski, 2013; Beitler *et al.*, 2016). Além disso, as citocinas podem translocar-se para a circulação, gerando uma resposta inflamatória sistêmica e desencadeando a disfunção múltipla de órgãos, como acontece na SDRA (Tremblay *et al.*, 1997; Curley *et al.*, 2016). Tal reação biológica, em resposta às forças mecânicas, é definida como biotrauma. Uma manifestação precoce e frequente do biotrauma é o recrutamento de neutrófilos a partir do leito vascular para os pulmões, em resposta à liberação de citocinas e quimiocinas epiteliais e macrófagos alveolares (Matthay e Zemans, 2011; Kuchnicka e Maciejewski, 2013).

A LPIV é resultado da interação complexa entre as várias forças mecânicas que atuam sobre as estruturas do pulmão. Essas forças foram definidas como estresse (força por unidade de área) e tensão (força ao longo do eixo longitudinal) (Kuchnicka e Maciejewski, 2013). Dois principais mecanismos podem levar à LPIV: dano direto à

membrana capilar alveolar e matriz extra celular; ou mecanotransdução, que é a conversão de um estímulo mecânico em sinais bioquímicos e moleculares intracelulares quando o epitélio alveolar ou endotélio vascular é estirado durante a VM (Kuchnicka e Maciejewski, 2013; Sutherasan *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015). Esse estímulo provoca a expansão da membrana plasmática e desencadeia a sinalização celular através de mediadores inflamatórios que influenciam a disfunção pulmonar e celular sistêmica (Matute-Bello *et al.*, 2008; Sutherasan *et al.*, 2014). Receptores transmembranares, tais como integrinas e canais iônicos ativados por estiramento são identificados como as estruturas-chave na mecanotransdução e desencadeiam processos intracelulares (Halbertsma *et al.*, 2005). A tensão mecânica gerada durante a VM leva a uma resposta endotelial ativa que induz as vias de sinalização a um aumento da permeabilidade vascular (Park-Windhol e D'amore, 2016). Em condições fisiológicas, a permeabilidade microvascular é estreitamente regulada; no entanto, durante a LPIV, a ruptura da barreira vascular resulta no recrutamento de leucócitos (De Prost *et al.*, 2011), sendo os neutrófilos predominantes no LBA de pacientes com LPA (Tasaka *et al.*, 2008). Nós constatamos que houve um maior recrutamento de células inflamatórias no grupo GP, especialmente influxo de neutrófilos.

Os resultados obtidos neste trabalho vão ao encontro dos resultados obtidos por Hirsch e colaboradores, que avaliaram a resposta inflamatória em animais submetidos à VM e expostos a fumaça de cigarro, eles observaram um maior recrutamento de neutrófilos no grupo submetido à VM + fumaça de cigarro, e também relataram que houve aumento no recrutamento de neutrófilos nos animais submetidos apenas à VM com PEEP de 4 cmH₂O, quando comparados ao grupo controle (Hirsch *et al.*, 2014). Choudhury e colaboradores demonstraram que uma estratégia ventilatória lesiva induz um recrutamento de neutrófilo na fase inicial da LPIV (Choudhury *et al.*, 2004). A presença de neutrófilos nos espaços aéreos é uma característica consistente da lesão pulmonar em humanos e em animais (Grommes *et al.*, 2012), pois são as primeiras células do sistema imunológico a serem recrutadas para o local da lesão ou inflamação. Após a ativação, os neutrófilos migram através do interstício para o espaço alveolar (Grommes e Soehnlein, 2011). E em algumas circunstâncias podem contribuir direta ou indiretamente para a lesão pulmonar. Um dos mecanismos em que os neutrófilos podem

causar danos ao pulmão é através da produção de espécies reativas de oxigênio (Pittet *et al.*, 1997; Syrkina *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2014). Os neutrófilos se acumulam na microcirculação pulmonar e se tornam ativados, levando à liberação de mediadores tóxicos (Matthay e Zemans, 2011).

Na análise do leucograma, não observamos diferenças significativas nos leucócitos totais; houve, entretanto, um aumento do número de neutrófilos no sangue dos animais do grupo GP. A ativação e transmigração de neutrófilos circulantes do sangue para o espaço alveolar são consideradas passos críticos no desenvolvimento de LPA e da SDRA (Rose *et al.*, 2003; Reutershan e Ley, 2004; Syrkina *et al.*, 2008; Tasaka *et al.*, 2008). Os neutrófilos ativados contribuem para o aumento da permeabilidade endotelial (Bailey *et al.*, 2008). Segundo Rose (Rose *et al.*, 2003) e Matthay (Rose *et al.*, 2003; Matthay *et al.*, 2012) o aumento da permeabilidade alvéolo capilar também está ligada à transferência de eritrócitos para o espaço alveolar na SDRA. Os eritrócitos possuem um eficiente sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, pois estão continuamente expostos a fontes de EROs, visto que, transportam grandes quantidades de O₂ e NO (Sivilotti, 2004; Colombo *et al.*, 2012; Jabri *et al.*, 2016); Minneti e colaboradores (Minneti *et al.*, 2007) acreditam que, ao passar por regiões que apresentam um desequilíbrio redox, os eritrócitos podem contribuir para neutralizar os efeitos das EROs. Devido a sua mobilidade, essas células apresentam atividade antioxidante em toda a circulação (Cimen, 2008). Nós hipotetizamos que o aumento nos níveis séricos de eritrócitos no grupo GP está relacionado ao seu mecanismo de defesa antioxidante.

As quimiocinas e seus receptores são os principais mediadores do extravasamento de leucócitos para regulação do processo inflamatório e a migração direcional para tecidos inflamados e infectados (Bonecchi e Graham, 2016). Independentemente da sua função fisiopatológica, os mediadores inflamatórios podem servir como um indicador sensível da lesão pulmonar durante a ventilação mecânica. Esta hipótese é também apoiada por estudos da rede ARDSnet em que a mortalidade está correlacionada aos níveis de citocinas e não às medidas físicas do barotrauma (Meier *et al.*, 2008).

Halbertsma, Tasaka e Wang mostraram que a VM regula positivamente a produção de citocinas pulmonares, o que pode resultar em reação inflamatória, agravando a lesão pulmonar. Essa reação inflamatória não é restrita aos pulmões, envolve também a circulação sistêmica, o que justifica o fato de que a maioria dos pacientes com SDRA não morrem por falência respiratória, mas em decorrência da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (Halbertsma *et al.*, 2005; Tasaka *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016).

Um mecanismo proposto para LPIV é que a deformação mecânica do tecido pulmonar estimula uma resposta inflamatória aguda caracterizada pelo aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias e pelo recrutamento de células inflamatórias (Chapman *et al.*, 2005). O infiltrado de neutrófilos no tecido pulmonar pode levar ao aumento nos níveis de citocinas e quimiocinas inflamatórias como IL-6, KC e MIP-2, que contribuem para o desenvolvimento da patogênese do pulmão, incluindo LPIV (Reddy *et al.*, 2007). A CCL2 desempenha um papel importante na atração de monócitos e, em muitos processos inflamatórios, tem sido mostrado que está envolvida numa ampla variedade de doenças com ou sem um aspecto inflamatório evidente (Oberthür *et al.*, 2015). CCL3 é uma das quimiocinas necessárias para o recrutamento de neutrófilos circulantes no pulmão em modelo de lesão pulmonar por Lipopolisacárido (LPS). Resultados semelhantes foram encontrados em modelos experimentais de LPIV, onde o estiramento pulmonar resultou no aumento dos níveis de CCL3 (Halbertsma *et al.*, 2005; Blázquez-Prieto *et al.*, 2015). CCL 5 desempenha um papel importante no recrutamento de neutrófilos em modelos de LPA (Pan *et al.*, 2000; Grommes *et al.*, 2012).

A expressão celular e o aumento nos níveis de quimiocinas, como CCL2, CCL3 CCL5 em fluidos orgânicos, têm sido relacionados com o influxo de leucócitos em eventos agudos (Murta *et al.*, 2016). Pan e colaboradores relataram que a super expressão de CCL5 promove aumento no infiltrado de neutrófilos para as vias respiratórias de camundongos, tanto na presença, como na ausência de inflamação das vias aéreas induzida por antígeno (Pan *et al.*, 2000). CCL3 também está relacionada com o recrutamento de neutrófilos em modelo murino (Belperio *et al.*, 2006). A fase

inicial da LPIV é caracterizada pela libertação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além do recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar (Porto e Stein, 2016).

Neste trabalho, observamos que houve um aumento nos níveis de CCL5 e CCL3 no tecido pulmonar dos animais do grupo GP, o que está relacionado com um maior influxo de leucócitos, especialmente o recrutamento de neutrófilos. Nossos dados vão ao encontro dos resultados de Vaneker e colaboradores (Vaneker *et al.*, 2007) que relataram aumento nos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no homogeneizado pulmonar de camundongos C57/Black 6 ventilados, durante 60 minutos, com volume corrente de 8 ml/Kg e PEEP de 4 cmH₂O, quando comparados ao grupo de animais que não foram ventilados. Ester K. Wolthuis e colaboradores (Wolthuis *et al.*, 2009) relataram que a VM, mesmo com VC fisiológico (7,5 ml/Kg) e PEEP de 2 cmH₂O, induziu lesão pulmonar em camundongos sem lesão pulmonar prévia, através do aumento das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Villar e colaboradores (Villar *et al.*, 2009) relataram que a aplicação da PEEP, durante a VM com um VC de 20ml/Kg em ratos saudáveis, induziu a uma lesão pulmonar, através do aumento nos níveis de citocinas e infiltrado de células inflamatórias, quando comparados com o grupo ventilado com VC de 20ml/Kg e ZEEP.

O estiramento cíclico das células epiteliais do pulmão, durante a VM, provoca a liberação das EROs (Syrkina *et al.*, 2008). A produção de altos níveis das EROs está relacionada ao desequilíbrio redox, que é caracterizado pela redução na proporção antioxidante/oxidante, estando os oxidantes em maior quantidade (Campos *et al.*, 2015). As EROs atuam como toxina celular e como mensageiros secundários, que modulam a sinalização intracelular, culminando na ativação de cascata inflamatória, no infiltrado de neutrófilos e na produção de citocinas (Syrkina *et al.*, 2008). No desequilíbrio redox, as espécies reativas provocam modificações desfavoráveis aos componentes celulares, tais como: danos às proteínas, à peroxidação lipídica e ao ácido desoxirribonucleico (DNA). A carbonilação de proteína resulta na perda da sua função, sendo considerada um biomarcador de estresse oxidativo nos pulmões (Ahmad *et al.*, 2008) e pode prejudicar a sinalização e atividades funcionais e estruturais das proteínas, tendo assim impactos

significativos em várias enfermidades (Kehrer e Klotz, 2015). A peroxidação lipídica refere-se a um processo em que as espécies radicais atacam lipídeos que contêm dupla ligação carbono-carbono, especialmente ácidos graxos poliinsaturados, que são componentes estruturais de membranas celulares da bicamada lipídica. Danos aos ácidos graxos poliinsaturados levam à perda rápida da integridade da membrana e ao comprometimento da função celular (Zhou *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014; Arben Santo, 2016).

Para determinar se a PEEP poderia contribuir para o desequilíbrio redox durante a VM, nós avaliamos os níveis de proteína Carbonilada e formação de TBARS. Nossos resultados mostraram que, no grupo GP, houve elevado conteúdo de TBARS e proteína carbonilada. Pacientes com SDRA apresentam altos níveis de produtos da peroxidação lipídica em seu plasma, que é evidência do aumento da peroxidação lipídica durante o desenvolvimento da LPA e da SDRA (Reddy *et al.*, 2007). Reddy e colaboradores relataram que, em estudos com culturas de células após 30 minutos de exposição de células epiteliais e endoteliais pulmonares ao estresse cíclico, ocorre aumento na produção de EROS, sugerindo que estas espécies reativas podem contribuir para o desenvolvimento da lesão pulmonar induzida pela ventilação (Reddy *et al.*, 2007). Oxidantes derivados de neutrófilos desempenham um papel importante nas lesões epiteliais e podem induzir a lesão pulmonar aguda (Grommes e Soehnlein, 2011; Matthay e Zemans, 2011). Zemans e colaboradores (Zemans *et al.*, 2009) relataram que camundongos, que apresentavam deficiência na NADPH-oxidase, a enzima chave necessária para gerar uma explosão respiratória, foram protegidos do aumento da permeabilidade pulmonar em um modelo de SDRA.

Os sistemas específicos de defesa pulmonar incluem as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase e existem para neutralizar o desequilíbrio redox (Sun *et al.*, 2015). A SOD catalisa a dismutação do O_2^- em H_2O_2 e oxigênio e a CAT atua sobre o H_2O_2 produzido pela SOD para formar água e oxigênio molecular. A CAT está presente em quantidades substanciais no pulmão e, como a SOD, pode ser facilmente regulada (Sarma e Ward, 2011). A glutatona é um dos antioxidantes não enzimáticos mais importantes e atua na manutenção da homeostase redox. A glutatona

existe no estado reduzido (GSH) ou no estado oxidado (GSSG). EROS e RNS são reduzidos pela GSH não enzimaticamente, porém a redução do H_2O_2 requer a presença da glutathiona peroxidase (GPX). Ambas as reações levam à formação de GSSG, que é reduzida novamente em GSH na presença da glutathiona redutase e NADPH (Sarma e Ward, 2011; Koekkoek e Van Zanten, 2016). A razão GSH/GSSG é frequentemente utilizada como um indicador do estado redox celular (Kehrer e Klotz, 2015; Arben Santo, 2016). O infiltrado de neutrófilos nos tecidos pulmonares pode resultar em aumento nos níveis de EROS, e as enzimas antioxidantes são essenciais para a resposta às EROS geradas pelos neutrófilos. Desse modo, as EROS, em resposta à MV, podem contribuir para o desequilíbrio redox (Papaiahgari *et al.*, 2007)

Nossos resultados mostraram que houve aumento na atividade das enzimas antioxidantes e redução na razão GSH/GSSG. Leff e colaboradores investigaram a possibilidade de prever o desenvolvimento da SDRA, através da análise de marcadores do desequilíbrio redox no sangue de pacientes com sepse, e observaram que houve um aumento da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase nos pacientes que evoluíram com a SDRA (Leff *et al.*, 1992). Reddy e colaboradores demonstraram que a exposição ao estiramento cíclico causou uma redução significativa na razão GSH/GSSG em células epiteliais do pulmão (Reddy *et al.*, 2007). Murta e colaboradores observaram que houve redução da razão GSH/GSSG na presença do desequilíbrio redox (Murta *et al.*, 2016).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com De Prost e colaboradores, que relataram que o aumento do volume inspiratório final, através do aumento da capacidade residual funcional (isto é, com a aplicação da PEEP), pode causar lesão pulmonar independentemente do volume corrente. Como resultado, a aplicação da PEEP, quando o volume corrente é mantido constante, aumenta o volume inspiratório final e pode ser prejudicial (De Prost *et al.*, 2011). Muito se fala sobre a estratégia ventilatória protetora e da relação entre baixo volume corrente e redução na taxa de mortalidade. Entretanto, não se pode afirmar que a PEEP contribui para reduzir a mortalidade dos pacientes com SDRA. Além disso, já foi demonstrado que altos níveis de PEEP não diminuem a mortalidade nem o tempo de ventilação (Gattinoni *et al.*, 2006). De acordo com Dreyfuss e colaboradores (Dreyfuss e Saumon, 1998), os efeitos

benéficos da PEEP podem ser compensados pelas consequências da distensão pulmonar. A PEEP tem efeitos benéficos sobre as trocas gasosas; entretanto, pode induzir o edema pulmonar durante LPA. A melhora da oxigenação ocorre em consequência da reabertura dos alvéolos e da redistribuição do fluido do edema em direção ao espaço intersticial.

Neste trabalho, observamos que a VM com PEEP de 5 cm/H₂O promoveu expansão alveolar, porém não encontramos diferenças significativas na densidade de volume de septo e de espaço aéreo alveolar. Acreditamos, portanto, que o período de 60 minutos de ventilação mecânica não foi suficiente para promover alterações na estrutura dos alvéolos.

A maioria dos estudos publicados foram realizados em situações experimentais, que diferem do cenário clínico, pois foram realizados em modelos experimentais de lesão pulmonar induzida previamente ou utilizando estratégias ventilatórias lesivas, tornando difícil comparar os resultados encontrados. Diferentemente, em nosso trabalho, utilizamos uma estratégia ventilatória recomendada pelas Diretrizes Brasileiras de Ventilação Mecânica (Barbas, Isola, *et al.*, 2014).

7. CONCLUSÃO

A ventilação mecânica, com o uso da PEEP, desencadeou uma resposta inflamatória e o desequilíbrio redox nos pulmões de ratos saudáveis após um curto período de ventilação.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, P.; SANTISBON, E.; VARON, J. "The use of positive end-expiratory pressure in mechanical ventilation". **Crit Care Clin**, v. 23, n. 2, p. 251-61, x, Apr 2007. ISSN 0749-0704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368169> >.

ADAMS, D. H.; LLOYD, A. R. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. **Lancet**, v. 349, n. 9050, p. 490-5, Feb 1997. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9040590> >.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660> >.

AHMAD, R. et al. Malondialdehyde and protein carbonyl as biomarkers for oxidative stress and disease progression in patients with chronic myeloid leukemia. **In Vivo**, v. 22, n. 4, p. 525-8, 2008 Jul-Aug 2008. ISSN 0258-851X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18712183> >.

AKINCI, O. I. et al. Effects of body temperature on ventilator-induced lung injury. **J Crit Care**, v. 20, n. 1, p. 66-73, Mar 2005. ISSN 0883-9441. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16015518> >.

ARBEN SANTO, H. Z., AND Y. ROBERT LI. Free Radicals: From Health to Disease. **Reactive Oxygen Species**, v. 2, n. 4, p. 19, 2016.

BAILEY, T. C. et al. The effects of long-term conventional mechanical ventilation on the lungs of adult rats. **Crit Care Med**, v. 36, n. 8, p. 2381-7, Aug 2008. ISSN 1530-0293. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18596632> >.

BAKER, A. B. Artificial respiration, the history of an idea. **Med Hist**, v. 15, n. 4, p. 336-51, Oct 1971. ISSN 0025-7273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4944603> >.

BARBAS, C. S. et al. Brazilian recommendations of mechanical ventilation 2013. Part I. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 26, n. 2, p. 89-121, 2014 Apr-Jun 2014. ISSN 1982-4335. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25028944> >.

_____. Brazilian recommendations of mechanical ventilation 2013. Part 2. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 26, n. 3, p. 215-39, 2014 Jul-Sep 2014. ISSN 1982-4335. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25295817> >.

BARBAS, C. S. V. et al. Interação cardiopulmonar durante a ventilação mecânica. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, v. 3, p. 406-419, 1998.

BARBAS, C. S. V.; ÍSOLA, A. M.; FARIAS, A. M. D. C. DIRETRIZES BRASILEIRAS DE VENTILAÇÃO MECÂNICA – 2013. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 26, n. 2, p. 32, 2013.

BARKER, J. N. et al. Monocyte chemotaxis and activating factor production by keratinocytes in response to IFN-gamma. **J Immunol**, v. 146, n. 4, p. 1192-7, Feb 1991. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1899440> >.

BASKETT, T. F. Robert Hooke and the origins of artificial respiration. **Resuscitation**, v. 60, n. 2, p. 125-7, Feb 2004. ISSN 0300-9572. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15036728> >.

BATTISTI, V. et al. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. **Clin Biochem**, v. 41, n. 7-8, p. 511-8, May 2008. ISSN 1873-2933. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18313403> >.

BEITLER, J. R.; MALHOTRA, A.; THOMPSON, B. T. Ventilator-induced Lung Injury. **Clin Chest Med**, v. 37, n. 4, p. 633-646, Dec 2016. ISSN 1557-8216. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27842744> >.

BELPERIO, J. A. et al. The role of cytokines during the pathogenesis of ventilator-associated and ventilator-induced lung injury. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 27, n. 4, p. 350-64, Aug 2006. ISSN 1069-3424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16909369> >.

BEYER, J.; BECKENLECHNER, P.; MESSMER, K. The influence of PEEP ventilation on organ blood flow and peripheral oxygen delivery. **Intensive Care Med**, v. 8, n. 2, p. 75-80, Mar 1982. ISSN 0342-4642. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7042792> >.

BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **J Pathol**, v. 202, n. 2, p. 145-56, Feb 2004. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14743496> >.

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 1535-4989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22323365> >.

BLÁZQUEZ-PRIETO, J. et al. Exposure to mechanical ventilation promotes tolerance to ventilator-induced lung injury by Ccl3 downregulation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.

309, n. 8, p. L847-56, Oct 2015. ISSN 1522-1504. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26472813> >.

BONECCHI, R.; GRAHAM, G. J. Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the Inflammatory Response. **Front Immunol**, v. 7, p. 224, 2016. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27375622> >.

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 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BROCHARD, L. Watching what PEEP really does. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, n. 6, p. 1291-2, May 2001. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11371383> >.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633> >.

CAMPOS, K. K. et al. Exposure to cigarette smoke during pregnancy causes redox imbalance and histological damage in lung tissue of neonatal mice. **Exp Lung Res**, v. 40, n. 4, p. 164-71, Apr 2014. ISSN 1521-0499. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24669879> >.

_____. Long-term exposure to ultrasonically nebulized distilled water and saline causes cellular influx and oxidative stress in lung tissue of rats. **Exp Lung Res**, v. 41, n. 10, p. 546-53, 2015. ISSN 1521-0499. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26651882> >.

_____. Temporal analysis of oxidative effects on the pulmonary inflammatory response in mice exposed to cigarette smoke. **Cell Immunol**, v. 284, n. 1-2, p. 29-36, 2013 Jul-Aug 2013. ISSN 1090-2163. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23921078> >.

CARRASCO LOZA, R.; VILLAMIZAR RODRÍGUEZ, G.; MEDEL FERNÁNDEZ, N. Ventilator-Induced Lung Injury (VILI) in Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): Volutrauma and Molecular Effects. **Open Respir Med J**, v. 9, p. 112-9, 2015. ISSN 1874-3064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26312103> >.

CASTELLO, G.; COSTANTINI, S.; SCALA, S. Targeting the inflammation in HCV-associated hepatocellular carcinoma: a role in the prevention and treatment. **J Transl Med**, v. 8, p. 109, 2010. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21047421> >.

CHAPMAN, K. E. et al. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 289, n. 5, p. L834-41, Nov 2005. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15964900> >.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med**, v. 354, n. 6, p. 610-21, Feb 2006. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467548> >.

CHEN, C. M. et al. The protective effects of glutamine in a rat model of ventilator-induced lung injury. **J Thorac Dis**, v. 6, n. 12, p. 1704-13, Dec 2014. ISSN 2072-1439. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25589963> >.

CHEN, K. et al. Mechanical ventilation: past and present. **J Emerg Med**, v. 16, n. 3, p. 453-60, 1998 May-Jun 1998. ISSN 0736-4679. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9610977> >.

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 1521-0499. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20653468> >.

CHOU DHURY, S. et al. Mechanisms of early pulmonary neutrophil sequestration in ventilator-induced lung injury in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 287, n. 5, p. L902-10, Nov 2004. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15257987> >.

CHOW, C. W. et al. Oxidative stress and acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 29, n. 4, p. 427-31, Oct 2003. ISSN 1044-1549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500253> >.

CIENCEWICKI, J.; TRIVEDI, S.; KLEEBERGER, S. R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 122, n. 3, p. 456-68; quiz 469-70, Sep 2008. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18774381> >.

CIMEN, M. Y. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clin Chim Acta**, v. 390, n. 1-2, p. 1-11, Apr 2008. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243141> >.

COLOMBO, G. et al. Red blood cells protect albumin from cigarette smoke-induced oxidation. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29930, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238677> >.

CURLEY, G. F. et al. Biotrauma and Ventilator Induced Lung Injury: Clinical implications. **Chest**, Jul 2016. ISSN 1931-3543. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27477213> >.

DE PAULA COSTA, G. et al. Doxycycline and Benznidazole Reduce the Profile of Th1, Th2, and Th17 Chemokines and Chemokine Receptors in Cardiac Tissue from Chronic Trypanosoma cruzi-Infected Dogs. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 3694714, 2016 2016. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27688600> >.

DE PROST, N. et al., Eds. **Ventilator-induced lung injury: historical perspectives and clinical implications**. Ann Intensive Care, v.1, p.28, Ann Intensive Careed. 2011.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res**, v. 29, n. 6, p. 313-26, Jun 2009. ISSN 1557-7465. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19441883> >.

DREYFUSS, D.; SAUMON, G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 157, n. 1, p. 294-323, Jan 1998. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9445314> >.

FAGEVIK OLSÉN, M. et al. Evaluation of Pressure Generated by Resistors From Different Positive Expiratory Pressure Devices. **Respir Care**, v. 60, n. 10, p. 1418-23, Oct 2015. ISSN 1943-3654. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25944941> >.

FAN, E.; VILLAR, J.; SLUTSKY, A. S. Novel approaches to minimize ventilator-induced lung injury. **BMC Med**, v. 11, p. 85, 2013. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536968> >.

FARIAS, L. L. et al. Positive end-expiratory pressure prevents lung mechanical stress caused by recruitment/derecruitment. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 1, p. 53-61, Jan 2005. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377644> >.

GATTINONI, L. et al. Lung recruitment in patients with the acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, v. 354, n. 17, p. 1775-86, Apr 2006. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16641394> >.

_____. Positive end-expiratory pressure. **Curr Opin Crit Care**, v. 16, n. 1, p. 39-44, Feb 2010. ISSN 1531-7072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996966> >.

_____. Physical and biological triggers of ventilator-induced lung injury and its prevention. **Eur Respir J Suppl**, v. 47, p. 15s-25s, Nov 2003. ISSN 0904-1850. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14621113> >.

GEDDES, L. A. The history of artificial respiration. **IEEE Eng Med Biol Mag**, v. 26, n. 6, p. 38-41, 2007 Nov-Dec 2007. ISSN 0739-5175. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18189086> >.

GROMMES, J. et al. Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 185, n. 6, p. 628-36, Mar 2012. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22246174> >.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Mol Med**, v. 17, n. 3-4, p. 293-307, 2011 Mar-Apr 2011. ISSN 1528-3658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21046059> >.

HAITSMA, J. J. Physiology of mechanical ventilation. **Crit Care Clin**, v. 23, n. 2, p. 117-34, vii, Apr 2007. ISSN 0749-0704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368160> >.

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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301759> >.

HAUBER, H. P. et al. Effect of low tidal volume ventilation on lung function and inflammation in mice. **BMC Pulm Med**, v. 10, p. 21, 2010. ISSN 1471-2466. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20409304> >.

HELD, H. D. et al. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, n. 3 Pt 1, p. 711-6, Mar 2001. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254529> >.

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, 2014. ISSN 1466-609X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666941> >.

HOEGL, S. et al. Short-term exposure to high-pressure ventilation leads to pulmonary biotrauma and systemic inflammation in the rat. **Int J Mol Med**, v. 21, n. 4, p. 513-9, Apr 2008. ISSN 1107-3756. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18360698> >.

JABBARI, A. et al. Lung protection strategy as an effective treatment in acute respiratory distress syndrome. **Caspian J Intern Med**, v. 4, n. 1, p. 560-3, 2013. ISSN 2008-6164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009936> >.

JABRI, M. A. et al. Chamomile decoction extract inhibits human neutrophils ROS production and attenuates alcohol-induced haematological parameters changes and erythrocytes oxidative stress in rat. **Lipids Health Dis**, v. 15, p. 65, Mar 2016. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27029534> >.

JÚNIOR, D. R. D. A. et al. **Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares.** Jornal Brasileiro de Pneumologia 31: 8 p. 2005.

KACMAREK, R. M. The mechanical ventilator: past, present, and future. **Respir Care**, v. 56, n. 8, p. 1170-80, Aug 2011. ISSN 0020-1324. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21801579> >.

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L. O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Crit Rev Toxicol**, v. 45, n. 9, p. 765-98, 2015. ISSN 1547-6898. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26610815> >.

KIETZMANN, D. et al. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. **Intensive Care Med**, v. 19, n. 2, p. 78-81, 1993. ISSN 0342-4642. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8486874> >.

KIM, D. H. et al. Effect of a neutrophil elastase inhibitor on ventilator-induced lung injury in rats. **J Thorac Dis**, v. 6, n. 12, p. 1681-9, Dec 2014. ISSN 2072-1439. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25589960> >.

KOEKOEK, W. A.; VAN ZANTEN, A. R. Antioxidant Vitamins and Trace Elements in Critical Illness. **Nutr Clin Pract**, v. 31, n. 4, p. 457-74, Aug 2016. ISSN 1941-2452. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27312081> >.

KUCHNICKA, K.; MACIEJEWSKI, D. Ventilator-associated lung injury. **Anaesthesiol Intensive Ther**, v. 45, n. 3, p. 164-70, 2013 Jul-Sep 2013. ISSN 1731-2515. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24092514> >.

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> >.

LEFF, J. A. et al. Increased serum catalase activity in septic patients with the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**, v. 146, n. 4, p. 985-9, Oct 1992. ISSN 0003-0805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1416429> >.

LETSIOU, E. et al. Pathologic mechanical stress and endotoxin exposure increases lung endothelial microparticle shedding. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 52, n. 2, p. 193-204, Feb 2015. ISSN 1535-4989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25029266> >.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-57, 1994. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015469> >.

LI, Y. R. **Defining ROS in Biology and Medicine**. JIA, Z. e TRUSH, F. C. M. A. REACTIVE OXYGEN SPECIES. 1: 12 p. 2016.

LOETSCHER, P. et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 344-5, Jan 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450746> >.

LOHSER, J.; SLINGER, P. Lung Injury After One-Lung Ventilation: A Review of the Pathophysiologic Mechanisms Affecting the Ventilated and the Collapsed Lung. **Anesth Analg**, v. 121, n. 2, p. 302-18, Aug 2015. ISSN 1526-7598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26197368> >.

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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7674385> >.

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 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850883> >.

MATTHAY, M. A.; ZEMANS, R. L. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 147-63, 2011. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20936936> >.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 295, n. 3, p. L379-99, Sep 2008. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18621912> >.

MEIER, T. et al. Pulmonary cytokine responses during mechanical ventilation of noninjured lungs with and without end-expiratory pressure. **Anesth Analg**, v. 107, n. 4, p. 1265-75, Oct 2008. ISSN 1526-7598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806039> >.

MESQUITA, L. T. et al. New insights on amygdala: Basomedial amygdala regulates the physiological response to social novelty. **Neuroscience**, v. 330, p. 181-90, Aug 2016. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27261213> >.

MINETTI, M.; AGATI, L.; MALORNI, W. The microenvironment can shift erythrocytes from a friendly to a harmful behavior: pathogenetic implications for vascular diseases. **Cardiovasc Res**, v. 75, n. 1, p. 21-8, Jul 2007. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17412313> >.

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 1873-6424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26774767> >.

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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11296191> >.

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> >.

NAGATO, A. C. et al. Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. **Int J Exp Pathol**, v. 93, n. 4, p. 269-78, Aug 2012. ISSN 1365-2613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22804763> >.

NGIAM, N.; KAVANAGH, B. P. Ventilator-induced lung injury: the role of gene activation. **Curr Opin Crit Care**, v. 18, n. 1, p. 16-22, Feb 2012. ISSN 1531-7072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22157252> >.

NICHOLS, D.; HARANATH, S. Pressure control ventilation. **Crit Care Clin**, v. 23, n. 2, p. 183-99, viii-ix, Apr 2007. ISSN 0749-0704. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368165> >.

OBERTHÜR, D. et al. Crystal structure of a mirror-image L-RNA aptamer (Spiegelmer) in complex with the natural L-protein target CCL2. **Nat Commun**, v. 6, p. 6923, 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25901662> >.

PAN, Z. Z. et al. Inducible lung-specific expression of RANTES: preferential recruitment of neutrophils. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, n. 4, p. L658-66, Oct 2000. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11000125> >.

PAPAIHGARI, S. et al. Genetic and pharmacologic evidence links oxidative stress to ventilator-induced lung injury in mice. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 12, p. 1222-35, Dec 2007. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901416> >.

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 2001. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734443> >.

PARK-WINDHOL, C.; D'AMORE, P. A. Disorders of Vascular Permeability. **Annu Rev Pathol**, v. 11, p. 251-81, May 2016. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907525> >.

PASCHOAL, I. A.; VILLALBA, W. D. O.; PEREIRA, M. C. Insuficiência respiratória crônica nas doenças neuromusculares: diagnóstico e tratamento. **Jornal Brasileiro de pneumologia**, v. 33, n. 1, p. 11, 2007.

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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11141325> >.

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 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26350447> >.

PEREL, A.; STOCK, M. C. **Manual de mecanismos de suporte ventilatório**. Medsi Editora Médica e Científica Ltda 1994.

PITTET, J. F. et al. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 155, n. 4, p. 1187-205, Apr 1997. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9105054> >.

POLI, G. et al. Oxidative stress and cell signalling. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 9, p. 1163-82, May 2004. ISSN 0929-8673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15134513> >.

POLYAKOV, N. E. et al. Carotenoids as scavengers of free radicals in a Fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 3, p. 398-404, Aug 2001. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11461778> >.

PORTO, B. N.; STEIN, R. T. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing? **Front Immunol**, v. 7, p. 311, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27574522> >.

PROUDFOOT, A. E. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 2, p. 106-15, Feb 2002. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11910892> >.

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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591040> >.

REDDY, S. P.; HASSOUN, P. M.; BROWER, R. Redox imbalance and ventilator-induced lung injury. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 11, p. 2003-12, Nov 2007. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17822361> >.

REUTERSHAN, J.; LEY, K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. **Crit Care**, v. 8, n. 6, p. 453-61, Dec 2004. ISSN 1466-609X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15566616> >.

RICARD, J. D.; DREYFUSS, D.; SAUMON, G. Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, n. 5, p. 1176-80, Apr 2001. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11316656> >.

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 1473-6500. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22395439> >.

ROSE, C. E.; SUNG, S. S.; FU, S. M. Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. **Microcirculation**, v. 10, n. 3-4, p. 273-88, Jun 2003. ISSN 1073-9688. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12851645> >.

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 1992. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281207> >.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. Oxidants and redox signaling in acute lung injury. **Compr Physiol**, v. 1, n. 3, p. 1365-81, Jul 2011. ISSN 2040-4603. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23733646> >.

SHERRY, B. et al. Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. **J Exp Med**, v. 168, n. 6, p. 2251-9, Dec 1988. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3058856> >.

SILVA BEZERRA, F. et al. Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. **Nutrition**, v. 22, n. 11-12, p. 1192-201, 2006 Nov-Dec 2006. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17095405> >.

SILVA, F. C. et al. Chronic Treatment with Ivabradine Does Not Affect Cardiovascular Autonomic Control in Rats. **Front Physiol**, v. 7, p. 305, 2016. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27507948> >.

SILVA, P. L.; NEGRINI, D.; ROCCO, P. R. Mechanisms of ventilator-induced lung injury in healthy lungs. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 29, n. 3, p. 301-13, Sep 2015. ISSN 1878-1608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26643096> >.

SINGER, B. D.; CORBRIDGE, T. C. Basic invasive mechanical ventilation. **South Med J**, v. 102, n. 12, p. 1238-45, Dec 2009. ISSN 1541-8243. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20016432> >.

SIVILOTTI, M. L. Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. **Toxicol Rev**, v. 23, n. 3, p. 169-88, 2004. ISSN 1176-2551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862084> >.

SLUTSKY, A. S. Ventilator-induced lung injury: from barotrauma to biotrauma. **Respir Care**, v. 50, n. 5, p. 646-59, May 2005. ISSN 0020-1324. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15912625> >.

_____. 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 2015. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25844759> >.

SLUTSKY, A. S.; RANIERI, V. M. Ventilator-induced lung injury. **N Engl J Med**, v. 369, n. 22, p. 2126-36, Nov 2013. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24283226> >.

SOMERSON, S. J.; SICILIA, M. R. Historical perspectives on the development and use of mechanical ventilation. **AANA J**, v. 60, n. 1, p. 83-94, Feb 1992. ISSN 0094-6354. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1561855> >.

SUN, Z. T. et al. Effects of mechanical ventilation with different tidal volume on oxidative stress and antioxidant in lung. **J Anesth**, v. 29, n. 3, p. 346-51, Jun 2015. ISSN 1438-8359. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25475993> >.

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 1466-609X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24762100> >.

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 1440-1843. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18399853> >.

TASAKA, S. et al. Roles of oxidants and redox signaling in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 4, p. 739-53, Apr 2008. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18179359> >.

TKACZYK, J.; VÍZEK, M. Oxidative stress in the lung tissue--sources of reactive oxygen species and antioxidant defence. **Prague Med Rep**, v. 108, n. 2, p. 105-14, 2007. ISSN 1214-6994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18225638> >.

TREMBLAY, L. et al. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. **J Clin Invest**, v. 99, n. 5, p. 944-52, Mar 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9062352> >.

VALENÇA, S. O. S. et al. [Effects of hyperoxia on Wistar rat lungs]. **J Bras Pneumol**, v. 33, n. 6, p. 655-62, Dec 2007. ISSN 1806-3756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18200365> >.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar 2006. ISSN 0009-2797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16430879> >.

VAN KLAVEREN, R. J. et al. Involvement of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in superoxide anion and hydrogen peroxide generation by rat type II cells. **Thorax**, v. 52, n. 5, p. 465-71, May 1997. ISSN 0040-6376. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9176540> >.

VANEKER, M. et al. Mechanical ventilation in healthy mice induces reversible pulmonary and systemic cytokine elevation with preserved alveolar integrity: an in vivo model using clinical relevant ventilation settings. **Anesthesiology**, v. 107, n. 3, p. 419-26, Sep 2007. ISSN 0003-3022. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721244> >.

VILLAR, J. et al. Experimental ventilator-induced lung injury: exacerbation by positive end-expiratory pressure. **Anesthesiology**, v. 110, n. 6, p. 1341-7, Jun 2009. ISSN 1528-1175. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19417614> >.

VILLAR, J.; KACMAREK, R. M. The American-European Consensus Conference definition of the acute respiratory distress syndrome is dead, long live positive end-expiratory pressure! **Med Intensiva**, v. 36, n. 8, p. 571-5, Nov 2012. ISSN 1578-6749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23017630> >.

WANG, C. et al. Lung ventilation strategies for acute respiratory distress syndrome: a systematic review and network meta-analysis. **Sci Rep**, v. 6, p. 22855, 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26955891> >.

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 1468-201X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23539555> >.

WOLTHUIS, E. K. et al. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. **Crit Care**, v. 13, n. 1, p. R1, 2009. ISSN 1466-609X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19152704> >.

ZEMANS, R. L.; COLGAN, S. P.; DOWNEY, G. P. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 40, n. 5, p. 519-35, May 2009. ISSN 1535-4989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18978300> >.

ZHOU, X.; DAI, Q.; HUANG, X. Neutrophils in acute lung injury. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 17, p. 2278-83, Jun 2012. ISSN 1093-4715. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22652778> >.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 121-7, Feb 2000. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10714678> >.

ANEXO I: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais n.º. 2015/10, intitulado "Análise comparativa dos efeitos oxidantes do modo ventilatório controlado a volume com e sem uso de PEEP", 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	Sexo
Rato heterogêneo/ Wistar	18	14 semanas	Macho

Restrição de dieta: () sim (x) não

Especificar:

Este Certificado expira em: 06/11/2017

Ouro Preto, 6 de novembro de 2015.



Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP