

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

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE O DESEQUILÍBRIO
REDOX E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR E SISTÊMICA
EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À VENTILAÇÃO MECÂNICA**

Ana Beatriz Farias de Souza

Ouro Preto, 2017

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

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE O DESEQUILÍBRIO
REDOX E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR E SISTÊMICA
EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À VENTILAÇÃO MECÂNICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para obtenção do título de Mestre Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica metabólica e fisiológica

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

Ana Beatriz Farias de Souza

Ouro Preto, 2017

S895e

Souza, Ana Beatriz Farias de.

Efeitos da dieta hiperlipídica sobre o desequilíbrio redox e a resposta inflamatória pulmonar e sistêmica em camundongos submetidos à ventilação mecânica [manuscrito] / Ana Beatriz Farias de Souza. - 2017.

78f.: il.: color; graf; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.

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

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Obesidade . 2. Stress oxidativo. 3. Pulmões - Inflamação. I. Bezerra, Frank Silva. II. Menezes, Rodrigo Cunha Alvim de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.002:611.24

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



nupeb

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Efeitos da dieta hiperlipídica sobre o desequilíbrio redox e a resposta inflamatória pulmonar e sistêmica de camundongos submetidos à ventilação mecânica”

Aos seis dias do mês de outubro de 2017, às 13 horas e 30 minutos, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Ana Beatriz Farias de Souza**. 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. Luis Carlos Crocco Afonso
Examinador (UFOP)

Prof. Dr. Akinori Cardoso Nagato
Examinador(UFJF)

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: **06/10/2017**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil Tel: 55 (31) 3559-1681
E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/cbiol

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus e a minha mãe Denise Fátima de Souza,
por serem a razão de toda a minha existência.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Frank Silva Bezerra, pela oportunidade, pela confiança depositada em mim, por toda dedicação a este trabalho e por sempre me incentivar a buscar o conhecimento.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes por ter me recebido na UFOP e por todo auxílio, que foi essencial para a realização desse trabalho.

Aos amigos e colegas do LAFEx, por todo conhecimento compartilhado, por cada crítica construtiva, eutanásias, reuniões e pelos momentos de descontração. Durante esses dois anos muitas pessoas passaram pelo laboratório, mas cada um que passou pela minha vida durante esse tempo deixou alegrias e aprendizados. Muito obrigada Keila Campos, Natália Araújo, Thalles Freitas Castro, Mônica Campos, Camila de Oliveira, Obada Zeidan, Paula Ramalho, Paulo Cezar Corraide, Erika Tiemi Kozima, Sophia Pozzolini, Matheus Rocha, Pedro Alves, Jonathan Kofi Bassaw, Iuri Del Favero e Ruy Abrantes.

De forma especial tenho que agradecer a Máira Teresa Talma Chirico e a Mariana Reis Guedes por serem companheiras essenciais durante esse tempo. Nesses dois anos dividimos experimentos, dúvidas, conhecimento, angústias e risadas. Obrigada por ajudar a tornar o fardo um pouco mais leve nesse tempo.

Agradeço também aos professores que integram o LAFEx, Dr. Luiz Eduardo de Souza pela confiança depositada em mim para auxiliar em seu projeto de pesquisa. Dra. Silvia Dantas Cangussú, pela atenção e carinho e por sempre auxiliar nas análises histológicas. Ao técnico Luís Nicolau dos Reis por ser sempre prestativo e auxiliar na organização e manutenção do nosso laboratório.

Ao professor Dr. André Talvani do laboratório de Laboratório de Imunobiologia da Inflamação pela parceria, por disponibilizar o laboratório e os equipamentos para a realização dos ensaios imunoenzimáticos, sem as quais não seria possível finalizar esta dissertação. Ao Dr. Guilherme de Paula Costa por ser sempre solícito e por todo auxílio na realização dos ensaios imunoenzimáticos.

A professora Dr. Rosa Maria Esteves Arantes por abrir novamente as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar algumas análises. Ao Laboratório de Neuro-imuno Patologia Experimental (UFMG) em especial a Dr. Christiane Teixeira Cartelle pela amizade e por dedicar um pouco do seu tempo para me auxiliar na padronização da imunohistoquímica.

Agradeço aos laboratórios de Imunopatologia (LIMP) e Multiusuário de Microscopia, ao Centro de Ciência animal da Universidade Federal de Ouro Preto.

Aos professores e colegas do Departamento de Ciências Biológicas e do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) pelo apoio financeiro, em especial Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) que financiou esse projeto (“Edital 01/2016 - Demanda Universal” Processo N.: CDS - APQ-00823-16). Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) pela possibilidade de especialização. A UFOP por me receber e por proporcionar um aperfeiçoamento de qualidade e gratuito.

A minha família e amigos por entenderem a minha distância durante esses dois anos, por apoiarem as minhas escolhas e por se alegrarem comigo em cada vitória.

Principalmente quero agradecer a minha mãe Denise Fátima de Souza, por todo o suporte e por entender que nem sempre pude estar presente em momentos importantes, por me receber sempre de braços abertos e por apoiar as minhas decisões.

E a todos que de alguma forma me ajudaram – Muito obrigada!

“Não tenha medo de trabalho difícil. Nada vale a pena se vem fácil. Não deixe que os outros o desanimem ou digam-lhe que você não pode fazê-lo.”

Gertrude Belle Elion

RESUMO

A obesidade é uma doença de etiologia complexa e multifatorial influenciada por fatores genéticos, sociais e ambientais. O aumento da adiposidade leva a um quadro inflamatório crônico e provoca alterações em diversos sistemas como o sistema respiratório. Evidências mostram que ambiente hospitalar pacientes obesos cursam com mais complicações e necessitam de maior tempo suporte ventilatório. A ventilação mecânica (VM) é uma ferramenta utilizada em pacientes que apresentam insuficiência respiratória, embora apresente um papel terapêutico a VM pode induzir ou agravar uma lesão pulmonar. O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de uma dieta rica em lipídeos saturados sobre o desequilíbrio redox, resposta inflamatória pulmonar e sistêmica de camundongos submetidos ventilação mecânica. Para isso 40 camundongos C57BL/6 machos, 8 a 9 semanas, foram inicialmente divididos em dois grupos: controle, que recebeu uma dieta com 3,4% de lipídeos, e dieta, que receberam uma dieta com 45% de lipídeos. Os animais tiveram livre acesso a ração durante 10 semanas ao término do protocolo nutricional os grupos foram novamente divididos em quatro grupos: grupo controle (GC), Grupo ventilação mecânica (GVM), grupo dieta (GD) e grupo dieta ventilação mecânica (GDVM). Os animais dos grupos GVM e GDVM foram submetidos à ventilação mecânica por 60 minutos. Posteriormente todos os animais foram eutanasiados e foi coletado o lavado bronco alveolar, sangue, pulmão e tecido adiposo para a realização das análises bioquímica, histológicas e morfométricas. Os resultados mostraram que o grupo dieta a partir da terceira semana de experimento apresentou maior massa corporal quando comparado com o grupo controle. O índice de adiposidade corporal foi maior nos grupos GD e GDVM quando comparado com os grupos GC e GVM. Há um aumento significativo na concentração de colesterol plasmático nos grupos que receberam a dieta hiperlipídica quando comparado com os grupos que receberam a dieta padrão. O influxo de células para o lavado aumentou no GD quando comparado com o GC. Os animais do grupo GVM apresentaram um influxo de células ainda maior quando comparado com GC e GD, o influxo celular causado pela VM foi potencializado nos animais alimentados com uma dieta rica em lipídeos. A contagem diferencial de células do lavado mostrou um influxo de macrófagos no grupo GD quando comparado com GC e um influxo de macrófagos, neutrófilos e linfócitos nos grupos submetidos à VM quando comparado com os grupos GC e GD. Foi observado um aumento da oxidação de proteínas nos grupos GVM e GDVM em comparação com GC e GD. A peroxidação lipídica foi maior no grupo submetido à ventilação mecânica quando comparado com GC, GD e GDVM. A atividade de superóxido dismutase no homogeneizado pulmonar foi maior em GVM e GDVM em comparação com o controle. A atividade de catalase foi menor no em GD quando comparado com o GC e nos grupos submetidos à VM foi menor quando comparado com os grupos GC e GD. Os níveis de CCL2 e IL-22 nos grupos VMG e DVMG foi maior quando comparado com os grupos não submetidos à ventilação, entretanto os níveis de IL-10 e IL-17 nos grupos GVM e GDVM foi menor quando comparado com GC e GD. Portanto, a obesidade e à VM promoveram inflamação e estresse oxidativo pulmonar em camundongo C57BL/6 adultos.

Palavras chave: Obesidade, ventilação mecânica, estresse oxidativo, inflamação pulmonar.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial disease influenced by genetic, social and environmental factors. Increased adiposity leads to a chronic inflammatory state and causes changes in several systems such as the respiratory system. Evidences have shown that obese patients stay for long periods of hospitalization and mechanical ventilation, thus leading to more complications. Mechanical ventilation (MV) is a tool used in patients with respiratory insufficiency, although it has a therapeutic role in MV that can induce or aggravate pulmonary injury. The objective of this study was to evaluate the effects of a high fat diet and mechanical ventilation on pulmonary and systemic inflammatory response in C57BL/6 mice. Forty 8-9 weeks male C57BL/6 mice were initially divided into two groups: control group, which received a diet with 3.4% of lipids, and diet group, that received a diet with 45% of lipids. The animals had free access to feed for 10 weeks at the end of the nutritional protocol, the groups were divided into four groups: control group (CG), mechanical ventilation group (MVG), diet group (DG) and diet mechanical ventilation group (DMVG). The animals of the MVG and DMVG were submitted to mechanical ventilation for 60 minutes. The animals were euthanized and the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), blood, lungs and adipose tissue were collected for biochemical, histological and morphometric analyzes. The results showed that the diet group from the third week of experiment had higher body mass when compared to the control group. The animals of DG and DMVG presented higher adiposity index when compared to CG and MVG. There is a significant increase in plasma cholesterol concentration in groups that received the high fat diet when compared to the groups that received the standard diet. The influx of cells in BALF increased in GD when compared to CG. The animals of the MVG group had an even greater influx of cells when compared to GC and DG; the cellular influx caused by MV was potentialized in animals fed a high fat diet. Differential cell counts in BALF showed an influx of macrophages in DG group when compared to CG and an influx of macrophages, neutrophils and lymphocytes in the groups submitted to MV when compared to the CG and DG. Increased protein oxidation was observed in the MVG and DMVG compared to CG and DG. Lipid peroxidation was higher in the group submitted to mechanical ventilation when compared to CG, DG and DMVG. The superoxide dismutase activity was higher in MVG and DMVG compared to CG. The catalase activity was lower in DG when compared to CG and in the groups submitted to MV it was lower when compared to CG and DG. The levels of CCL2 and IL-22 in MVG and DMVG were increased, when compared to groups that weren't submitted to MV. However, there was a decrease in IL-10 and IL-17 in MVG and DMVG when compared to CG and DG. Therefore, the MV and obesity promoted inflammation and pulmonary oxidative stress in C57BL/6 adult mice.

Key words: Obesity, mechanical ventilation, oxidative stress, pulmonary inflammatory

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tecido adiposo na eutrofia e na obesidade.....	22
Figura 2. Recrutamento de neutrófilos para o pulmão.....	25
Figura 3. Principais enzimas antioxidantes.....	28
Figura 4. Ganho de massa corporal	46
Figura 5. Índice de adiposidade e área de adipócito	47
Figura 6. Fotomicrografia representativa de tecido adiposo epididimal coradas com HE.....	48
Figura 7. Análises estereológicas.....	52
Figura 8. Fotomicrografia representativa de pulmão coradas com HE.....	53
Figura 9. Razão núcleos marcados núcleos totais	54
Figura 10. Fotomicrografias representativas de pulmão coradas pela técnica de imunohistoquímica para HMGB1.....	58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Pontos de corte do Índice de Massa Corporal (IMC)	21
Quadro 2. Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	26
Quadro 3. Composição nutricional das dietas.....	32
Quadro 4. Parâmetros ventilatórios.....	33
Quadro 5. Curva padrão de albumina.....	38
Quadro 6. Reagentes utilizados para a análise da atividade de Superóxido dismutase	39
Quadro 7. Curva padrão para a análise de glutatona total.....	40
Quadro 8. Reagentes utilizados na dosagem de glutatona.....	41
Tabela 1. Análise hematológica e bioquímica do sangue.....	49
Tabela 2. Contagem total e diferencial de células do sangue.....	50
Tabela 3. Contagem total e diferencial de células do lavado broncoalveolar (LBA)	51
Tabela 4. Marcadores inflamatórios no pulmão	56
Tabela 5. Biomarcadores do estresse oxidativo	57

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Obesidade	20
2.2 Ventilação Mecânica	23
2.3 Estresse Oxidativo	25
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 Animais	31
4.2 Grupos Experimentais	31
4.3 Composição da dieta	31
4.4 Avaliação da massa corporal	32
4.5 Ventilação mecânica	32
4.6 Eutanásia	33
4.7 Coleta do sangue	33
4.7.1 Esfregaço Sanguíneo	34
4.7.2 Análise bioquímica no plasma	34
4.8 Coleta do Lavado Broncoalveolar (LBA)	34
4.8.1 Contagem total e diferencial de células do LBA	34
4.9 Pulmões	35
4.9.1 Processamento tecidual	35
4.9.2 Imunohistoquímica	35
4.9.3 Análises estereológicas e morfométricas do parênquima pulmonar	36
4.9.4 Homogeneizado pulmonar	37
4.10 Biomarcadores de estresse oxidativo e dano	37
4.10.1 Proteínas totais	37
4.10.2 Atividade da Superóxido Dismutase	38
4.10.3 Atividade da Catalase	39
4.10.4 Sistema glutaciona	40
4.10.5 Análise de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	41
4.10.6 Proteína Carbonilada	42

4.11	Ensaio imunoenzimático do pulmão.....	43
4.12	Tecido adiposo	44
4.12.1	Índice de adiposidade.....	44
4.12.2	Análise morfológica do tecido adiposo epididimal	44
4.13	Análises estatísticas	45
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Ganho de massa corporal	46
5.2	Índice de adiposidade corporal e área de adipócitos.....	47
5.3	Hemograma e análises bioquímicas do sangue.....	49
5.4	Contagem total e diferencial de células do sangue	49
5.5	Análise do influxo de células para o lavado broncoalveolar.....	50
5.6	Análises estereológicas do parênquima pulmonar	52
5.7	Imunohistoquímica.....	54
5.8	Ensaio imunoenzimático para marcadores inflamatórios	56
5.9	Biomarcadores do estresse oxidativo.....	56
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÕES	65
8	FINANCIAMENTO.....	66
9	REFERÊNCIAS	67
10	ANEXO	79

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP** – Adenosina trifosfato
- BHT** – Butil hidróxitolueno
- BSA** – Albumina bovina
- CAT** – Catalase
- CCA** – Centro de Ciência Animal
- CRF** – Capacidade Residual Funcional
- DAB** – 3,3 diaminobenzidina
- DAMP** – Padrão molecular associado ao dano
- DCNT** – Doença Crônica não Transmissível
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DNA** – Ácido desoxiribonucléico
- DNPH** – 2,4- difenilhidrazina
- DTNB** – Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
- ENDEF** – Estudo Nacional da Despesa Familiar
- ER** – Espécie reativa
- ERO** – Espécie Reativa de Oxigênio
- ERV** – Volume Expiratório de Reserva
- GC** – Grupo controle
- GD** – Grupo dieta
- GDVM** – Grupo dieta ventilação mecânica
- Gpx** – Glutaciona peroxidase
- Grd** – Glutaciona redutase
- GSH** – Glutaciona reduzida
- GSSG** – Glutaciona oxidada
- GVM** – Grupo ventilação mecânica
- HE** – Hematoxilina e Eosina
- HMGB1** – *High mobility group box 1*
- IAC** – Índice de adiposidade corporal

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IL-17 – Interleucina 17

IL-22 – Interleucina 22

IMC – Índice de Massa Corporal

KC – Quimiocina derivada de queratinócito

KPE – Tampão fosfato de potássio

LBA – Lavado broncoalveolar

LFC – Laboratório de Fisiologia Cardiovascular

LIMP – Laboratório de Imunopatologia

LPIV – Lesão pulmonar induzida pelo ventilador

MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócitos

MIP-2 – Proteína Inflamatória de Macrófagos 2

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

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NIPE – Laboratório de Neuro-imuno Patologia Experimental

NUPEB – Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAI-1 – Inibidor do ativador de plasminogênio 1

PBS – Solução salina fosfatada

PEEP – Pressão positiva ao final da expiração

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares

SARA – Síndrome do desconforto respiratório agudo

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SNC – Soro normal de cabra

SOD – Superóxido dismutase

SSA – Ácido sulfosalicílico

TAE – Tecido adiposo epididimal

TAM – Tecido adiposo mesentérico

TAR – Tecido adiposo retroperitoneal

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

TEA – Trietanolamina

TNF α – Fator de necrose tumoral α

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

VM – Ventilação Mecânica

VPP – Ventilação por pressão positiva

Vva – Densidade de volume de alvéolo

Vvsa – Densidade de volume de septo alveolar

1. INTRODUÇÃO

A prevalência de obesidade está aumentando em todo o mundo, está associada a diversas comorbidades e constitui uma ameaça importante para a saúde pública global (Tilg e Moschen, 2006). Embora sua patogênese não esteja completamente esclarecida, sabe-se que seu desenvolvimento não envolve uma única causa, mas sim uma combinação complexa de diversas condições causada por múltiplos fatores que resultam no fenótipo da doença. A etiologia da obesidade envolve a contribuição de fatores genéticos, que podem ser atenuados ou exacerbados por fatores dietéticos, ambientais e psicossociais. A obesidade, particularmente o aumento da adiposidade visceral promove o aumento na produção de moléculas de adesão, recrutamento e diferenciação de monócitos, maior produção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo e a diminuição nos níveis circulantes de citocinas anti-inflamatórias (Parameswaran *et al.*, 2006; Ouchi *et al.*, 2011).

Recentemente, tem-se estudado o papel da proteína *High mobility group box 1* (HMGB1) na obesidade e alguns estudos demonstraram que a proteína está envolvida com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (Gunasekaran *et al.*, 2013; Montes *et al.*, 2015). A HMGB1 é uma proteína amplamente expressa que desempenha múltiplos papéis em processos patológicos e fisiológicos (Ding *et al.*, 2017). Em todos os tipos celulares, a HMGB1 se liga ao DNA de modo a estabilizar a molécula, participa dos processos de transcrição e reparo do DNA, promove a resposta inflamatória a sinais estéreis e infecciosos e está envolvida na coordenação de respostas imunes inatas e adaptativas. Sob sinais como estresse, morte celular, infecção ou inflamação, a HMGB1 atua como um padrão molecular associado ao dano (DAMP) aumentando a produção de citocinas inflamatórias e promovendo o recrutamento de células inflamatórias para o tecido danificado (Gunasekaran *et al.*, 2013).

A obesidade além de promover alterações no estado inflamatório apresenta efeitos sobre a fisiologia respiratória (Ferrante, 2007). O acúmulo de tecido adiposo na caixa torácica e na cavidade abdominal promove um acréscimo de carga sobre a musculatura respiratória, como resultado ocorre uma diminuição da complacência respiratória, em indivíduos obesos a complacência é reduzida em dois terços quando comparado com indivíduos eutróficos, além disso, ocorre aumento da resistência de vias aéreas (Parameswaran *et al.*, 2006; Ashburn *et al.*, 2010; Sebastian, 2013). O aumento da resistência de vias aéreas está associado ao maior trabalho da musculatura respiratória e ao maior gasto energético durante a respiração (Koenig, 2001). Além disso, na obesidade a massa corporal

excessiva promove um padrão respiratório rápido e superficial, uma menor capacidade residual funcional (CRF) e uma inversão na relação ventilação perfusão (Sebastian, 2013). Jones e Nzekwu (2006) demonstraram uma relação inversa entre Índice de Massa Corporal (IMC), CRF e Volume de Reserva Expiratório (VRE) na qual o aumento IMC esteve associado a uma redução de CRF e VRE. Na prática clínica, o estado inflamatório crônico e modificações na fisiologia respiratória estão associadas à maior morbidade. Dados recentes apontam que em unidades de terapia intensiva cerca de 20% dos pacientes internados são obesos ou obesos graves (Anzueto *et al.*, 2011). Pacientes obesos necessitam de maior tempo de internação e de maior tempo de suporte ventilatório (Oliveros e Villamor, 2008). Além disso, esses estão mais susceptíveis ao desenvolvimento de complicações como a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) e insuficiência renal aguda quando estão sob à ventilação mecânica (Anzueto *et al.*, 2011).

A ventilação mecânica (VM) é uma ferramenta utilizada em pacientes que apresentam insuficiência respiratória (Lionetti *et al.*, 2005; Yildiz *et al.*, 2015), embora apresente importante papel terapêutico, a VM pode provocar uma lesão pulmonar ou ainda agravar uma lesão pré-existente, resultando na lesão pulmonar induzida pelo ventilador (Slutsky e Ranieri, 2013; Wang *et al.*, 2017). Os mecanismos pelos quais essa lesão pulmonar induzida pelo ventilador (LPIV) se desenvolve não estão completamente esclarecidos, mas estudos demonstraram que estiramento cíclico provocado pela VM pode resultar em dano às células epiteliais alveolares e aumento de permeabilidade, o que está associado ao recrutamento de leucócitos para o espaço aéreo, que irão produzir citocinas inflamatórias e de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Syrkina *et al.*, 2008; Kuchnicka e Maciejewski, 2013; Beitler *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

Apesar da relevância clínica e epidemiológica não foram realizados estudos em modelos animais que evidenciam a associação entre obesidade e VM e seus efeitos deletérios no organismo. Diante do exposto, justifica-se a necessidade de estudar em modelo animal, a obesidade induzida por dieta associada à VM e seus efeitos sobre o desequilíbrio redox e a resposta inflamatória pulmonar e sistêmica em camundongos adultos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Obesidade

A obesidade pode ser definida como uma condição em que ocorre um acúmulo de gordura anormal ou excessivo no tecido adiposo. Embora sua patogênese não esteja completamente esclarecida seu desenvolvimento parece ser uma combinação complexa de diversos fatores como genéticos, sociais, ambientais e emocionais (WHO, 2000; Friedman, 2009). Recentemente, estudos têm demonstrado que fatores dietéticos como: o consumo de alimentos de alta densidade energética, ricos em carboidratos refinados, gorduras saturadas e trans são importantes na modulação do acúmulo de gordura nos adipócitos (Ng *et al.*, 2010; Martin, 2016).

A prevalência de obesidade está aumentando em todo o mundo e está associada ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo diabetes mellitus tipo 2, resistência à insulina, doenças cardiovasculares, distúrbios musculoesqueléticos, distúrbios respiratórios e câncer (Tilg e Moschen, 2006; Hossain *et al.*, 2007; Gregor e Hotamisligil, 2011). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a prevalência de obesidade em todo o mundo mais do que duplicou desde 1980. Em 2005, cerca de 1,6 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso e 400 milhões eram obesos (WHO, 2000; Bray *et al.*, 2009). Já em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos tinham sobrepeso e 600 milhões eram obesos (WHO, 2016).

No Brasil, a prevalência de obesidade e de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) aumentaram nos últimos cinquenta anos, como resultado de diversas alterações ilustradas pela diminuição na taxa de natalidade e mortalidade, aumento da expectativa de vida, transição demográfica e epidemiológica (Batista Filho e Rissin, 2003). Na década de setenta, o Estudo Nacional da Despesa Familiar (ENDEF) mostrou que a prevalência de sobrepeso e obesidade entre os homens era de 18,5% e 2,8% respectivamente, já entre as mulheres a era de 28,7% e 7,8% (Ibge, 1974-1975). Cerca de 30 anos após o primeiro estudo de base populacional que a apresentava um quadro nutricional da população brasileira a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) mostrou que a prevalência de sobrepeso e obesidade entre os homens era de 50,1% e 12,4% e entre as mulheres era de 48% e 16,9% respectivamente (Ibge, 2010). As estimativas mais recentes sobre o percentual de brasileiros

com sobrepeso e obesidade indicam que 52,3% dos adultos maiores de 18 anos apresentam sobrepeso e 17,07% são obesos (Brasil, 2017).

O diagnóstico da obesidade em adultos deve ser realizado através da associação de vários fatores como medidas antropométricas, inquéritos nutricionais e análise de parâmetros hematológicos. Entretanto, na prática clínica, a forma mais simples de avaliar o estado nutricional atual é através do cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), pois esse é um método não invasivo e de fácil execução. Embora apresente algumas limitações e não deva ser considerado sozinho para realização do diagnóstico, o IMC é um bom indicador de gordura corporal e apresenta boa correlação com doenças cardiovasculares (Chung, 2015). O índice é calculado pela razão entre a massa corporal e altura em metros ao quadrado (WHO, 1998). James e colaboradores (2001) estabeleceram valores de referência para o IMC como descrito no quadro a baixo:

Quadro 1: Pontos de corte do índice de massa corporal (IMC)

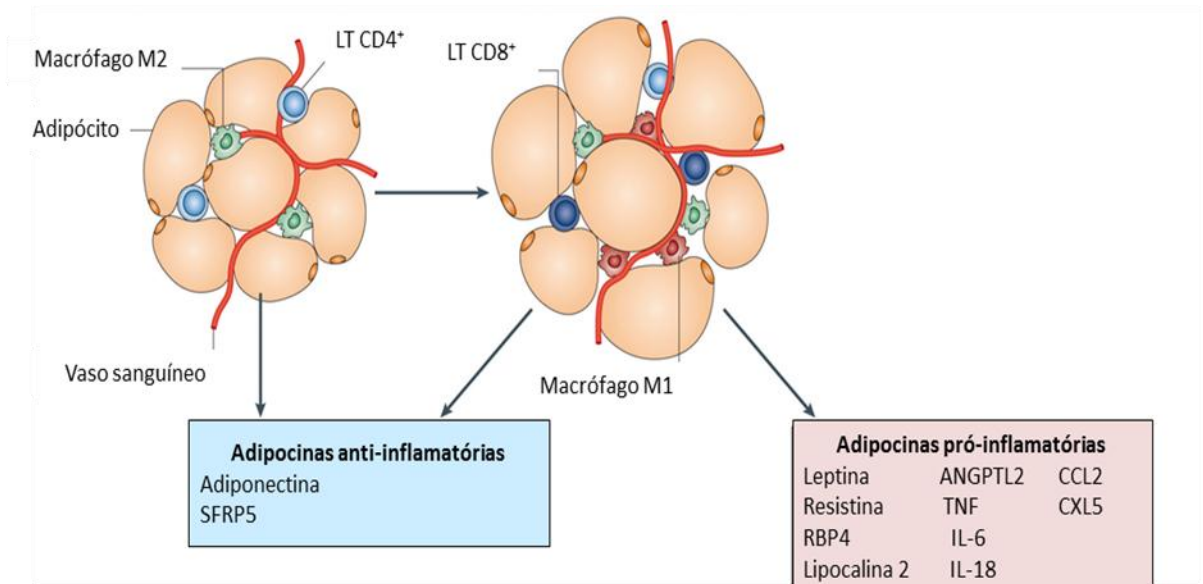
Classificação	IMC (Kg/m ²)
Baixo peso (magreza)	< 18,5
Eutrofia	18,5 – 24,9
Sobrepeso	25 – 29,9
Obesidade I	30 – 34,9
Obesidade II	35 – 39,9
Obesidade III	≥ 40

Fonte: Adaptado de James *et.al.*, 2001

Observações: IMC = Massa corporal (Kg)/ Estatura (cm)²

Indivíduos obesos (IMC ≥ 30Kg/m²) que apresentam acúmulo de gordura central ou visceral podem desenvolver resistência à insulina, dislipidemias e aterosclerose, o que parece estar intimamente relacionado com a atividade endócrina do tecido adiposo (Waki e Tontonoz, 2007). O tecido adiposo inicialmente era reconhecido como um depósito passivo para o estoque de energia em excesso, entretanto, a descoberta da leptina em 1994 (Zhang *et al.*, 1994) modificou esse conceito e o tecido adiposo passou a ser reconhecido como um órgão ativo que se comunica com outros tecidos e produz um variedade de hormônios e metabólitos (Waki e Tontonoz, 2007).

As substâncias produzidas pelo tecido adiposo como: leptina, adiponectina, resistina, $TNF\alpha$, IL-6, proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1 ou CCL2), inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), angiotensinogênio, visfastina e proteína de ligação ao retinol-4 estão envolvidas na regulação da homeostase metabólica (Shoelson *et al.*, 2007). Entretanto, a obesidade leva a alterações no tecido adiposo, como a hipertrofia e hiperplasia de adipócitos (Hosogai *et al.*, 2007). Os adipócitos hipertróficos aumentam a produção de citocinas inflamatórias, que apresentam efeitos locais como aumento da produção de moléculas de adesão, da permeabilidade vascular e infiltração de macrófagos (Figura.1). Uma vez que os macrófagos estão ativos no tecido adiposo, juntamente com os adipócitos, podem perpetuar um ciclo de recrutamento de macrófagos e produção de citocinas pró-inflamatórias que irão culminar em um estado inflamatório crônico (Tilg e Moschen, 2006; Shoelson *et al.*, 2007; Ouchi *et al.*, 2011).



Fonte: Adaptado de Ouchi *et al.*, 2011

Figura 1. Tecido adiposo na eutrofia e na obesidade

2.2 Ventilação Mecânica

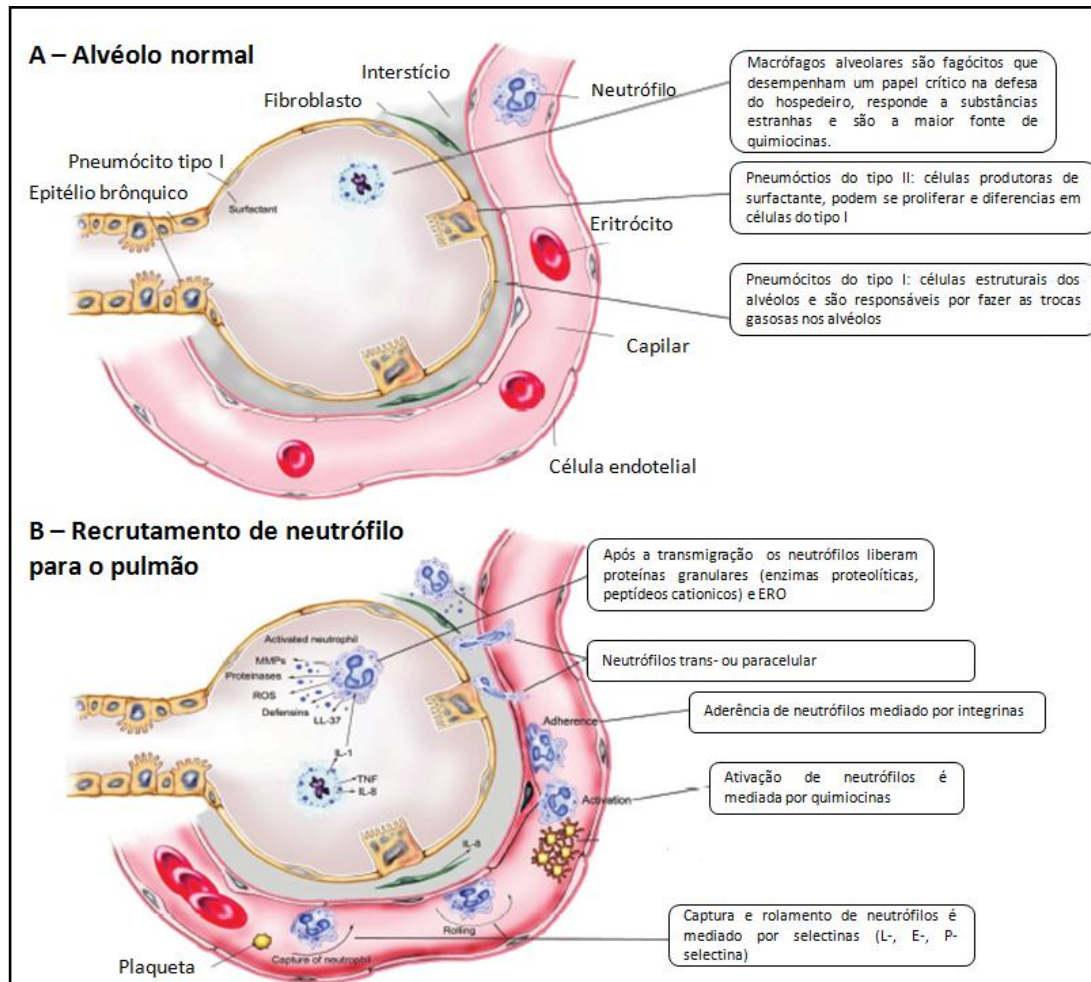
As abordagens contemporâneas utilizadas para a ventilação mecânica em unidades de terapia intensiva começaram muito antes do uso de ventiladores mecânicos modernos, que dispõem de microprocessadores, diferentes modos ventilatórios, entre outros. Os primeiros estudos que avaliaram a anatomia, fisiologia respiratória datam do século II depois de Cristo, Galeno introduziu a importância do estudo da anatomia no desenvolvimento da doença. No século XV, Paracelso utilizou de um fole manual para insuflar o pulmão de pessoas recentemente falecidas. Posteriormente, Andreas Vesalius e Robert Hook demonstraram que animais com tórax aberto poderiam ser mantidos vivos com o uso de pressão positiva nas vias aéreas (Carvalho, 2000; Slutsky, 2015).

Após os primeiros estudos, no século XIX foram desenvolvidos ventiladores baseados em princípios fisiológicos estabelecidos. Essencialmente, a ventilação era realizada usando pressão sub-atmosférica entregue ao redor do paciente para substituir ou aumentar o trabalho realizado pelos músculos respiratórios (Dries, 2016). Os pacientes podiam sentar ou deitar em uma caixa que encarcerava o corpo do pescoço para baixo, um êmbolo era utilizado para diminuir a pressão de ar na caixa, causando a inspiração, enquanto o reverso produzia a expiração. Entretanto, o acesso ao corpo e membros dos pacientes era difícil, o que gerava problemas para a realização de cuidados básicos pela equipe de enfermagem. Para resolver este problema, foram desenvolvidos quartos nos quais os pacientes ficavam deitados com a cabeça fora da sala, enquanto dentro pistões realizavam as mudanças de pressão necessárias para a manutenção da ventilação (Dries, 2016).

Entre os anos de 1935 e 1950, a epidemia de Poliomielite em Copenhague foi um evento decisivo na história da ventilação mecânica. Até aquele momento, a ventilação parecia ter utilidade, porém somente após o surto de poliomielite na década de 50 que seus benefícios foram comprovados e a ventilação passou a ser utilizada em todo o mundo. Durante a epidemia, a falta de recursos disponíveis para o tratamento de todos os pacientes e a alta taxa de mortalidade levou o diretor do principal hospital de Copenhague a convocar o anestesista Björk Ibsen. Ele percebeu que a morte dos pacientes estava associada à insuficiência respiratória e recomendou a realização de traqueostomia e ventilação por pressão positiva (VPP), com a introdução da VPP a taxa de mortalidade caiu drasticamente (Carvalho, 2000; Dries, 2016).

Após a introdução da vacina Salk e da vacina Sabin, a paralisia respiratória causada pela poliomielite virtualmente desapareceu e VM deixou de ser utilizada no tratamento de pacientes que apresentavam insuficiência respiratória decorrente da poliomielite. Atualmente, a ventilação mecânica (VM) é uma ferramenta utilizada no cuidado intensivo de pacientes que apresentam insuficiência respiratória aguda ou crônica agudizada, com objetivo de manter as trocas gasosas, aliviar o trabalho da musculatura respiratória, reverter ou evitar a fadiga da musculatura respiratória e diminuir o consumo de oxigênio (Carvalho *et al.*, 2007).

Embora apresente um importante papel terapêutico a VM pode provocar uma lesão pulmonar ou ainda agravar uma lesão pré-existente (Hoegl *et al.*, 2008; Chess *et al.*, 2010; Rocco *et al.*, 2012). Os mecanismos pelos quais essa lesão pulmonar induzida pelo ventilador (LPIV) se desenvolve não estão completamente esclarecidos, mas os estudos demonstram que a ação das forças mecânicas sobre os componentes do parênquima pulmonar resultam no recrutamento de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos que irão produzir citocinas inflamatórias e levar a uma resposta inflamatória local (Choudhury *et al.*, 2004; Yildiz *et al.*, 2015; Beitler *et al.*, 2016). O estiramento cíclico provocado pela VM pode resultar em dano às células epiteliais alveolares e aumento de permeabilidade, o que está associado ao recrutamento de neutrófilos para o espaço aéreo (Santos *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2016). A infiltração de células polimorfonucleares no pulmão em resposta a estímulos inflamatórios, inicialmente, não requer selectinas, em contraste com a circulação sistêmica, mas envolve alterações celulares, que não estão bem descritas. Entretanto, em um estágio tardio a selectinas e integrinas estão envolvidas no processo de adesão e captura de neutrófilos (Choudhury *et al.*, 2004). Além disso, a infiltração de neutrófilos no pulmão é controlada por quimiocinas e interleucinas produzidas por uma variedade de tipos celulares. Os macrófagos alveolares são a principal fonte de quimiocinas no espaço alveolar e produzem interleucina 8 (IL-8), uma interleucina quimiotática de neutrófilos (Santos *et al.*, 2005). Em roedores, as quimiocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos para o pulmão são: quimiocina derivada de queratinócitos (KC) e proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2). Uma vez ativos no espaço alveolar, os neutrófilos podem contribuir para o processo inflamatório desencadeado pela ventilação mecânica por diversas vias que incluem secreção de proteases, produção de espécies reativas de oxigênio, produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios (Grommes e Soehnlein, 2011) (Figura 2).



Fonte: Adaptado de Grommes e Soehnlein, 2011

Figura 2. Recrutamento de neutrófilos para o pulmão

2.3 Estresse Oxidativo

Os termos radicais livres e espécies reativas (ER) muitas vezes são utilizados como sinônimos, em muitos casos isso é correto, mas em outros não. Radicais livres são espécies que têm um ou mais elétrons desemparelhados, já as espécies reativas incluem tanto as espécies radicalares quanto outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados são reativas (Halliwell e Gutteridge, 2006 ; Lushchak, 2014). Coletivamente, o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) são espécies reativas de oxigênio (ERO), mas apenas O_2^- e OH^\cdot podem ser considerados radicais livres. Além do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila existem outras espécies reativas como peróxidos lipídicos e peróxidos protéicos, espécies reativas de nitrogênio, carbono, enxofre e halogênios (Lushchak, 2014) As principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio estão sumarizadas no quadro a baixo:

Quadro 2: Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Oxidante	Fórmula	Vias de produção da espécie reativa
Ânion superóxido	O_2^-	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^- + H^+$ $2O_2^- + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Hipoxantina + H_2O + $O_2 \rightleftharpoons$ xantina + H_2O_2 Xantina + H_2O + $O_2 \rightleftharpoons$ ácido úrico + H_2O_2
Radical hidroxil	OH^\cdot	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\cdot$
Ácido hipoclosoro	HOCl	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Radicais Peroxila	ROO^\cdot	$R^\cdot + O_2 \rightarrow ROO^\cdot$
Radical hidroperoxil	HOO^\cdot	$O_2^- + H_2O \rightleftharpoons HOO^\cdot + OH^-$
Óxido nítrico	NO	L-arginila \rightarrow NO^\cdot + L-citrulina
Peróxinitrito	$ONOO^\cdot$	$O_2^- + NO^\cdot \rightarrow ONOO^\cdot$

Fonte: Adaptado de Birben *et al.*, 2012

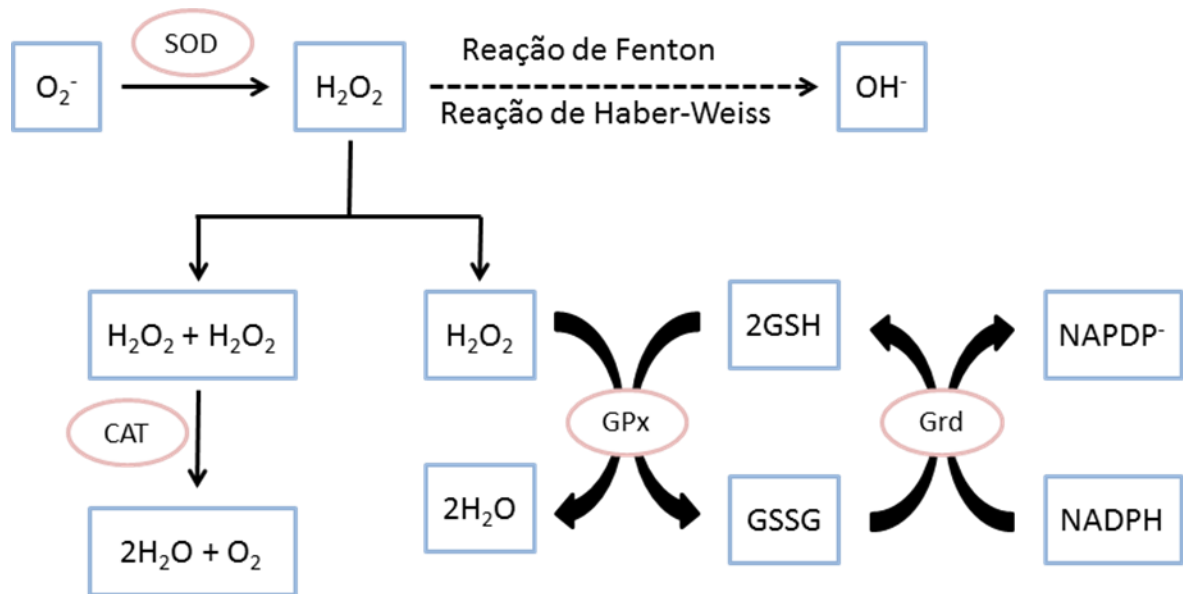
Espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas a partir de substâncias endógenas e exógenas (Rosanna e Salvatore, 2012). Em organismos vivos sob condições aeróbias, mais de 90% do oxigênio é reduzido à água pela ação da citocromo oxidase na membrana mitocondrial interna. A ação da cadeia transportadora de elétrons está associada à fosforilação oxidativa para a produção de energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP). Entretanto, uma parte do oxigênio consumido é reduzida através de vias sucessivas que convertem o oxigênio molecular em ânion superóxido, seguido pela redução de um elétron com concomitante aceitação de prótons para a produção de peróxido de hidrogênio. Embora as mitocôndrias sejam as principais produtoras das EROs, esses podem ser produzidos nas vias da xantina oxidase, via da Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NAPH-oxidase), no sistema citocromo P450, redutase microsomal e em células fagocíticas (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) (Birben *et al.*, 2012; Lushchak, 2014). As fontes exógenas de espécies reativas são radiação ionizante, alguns poluentes, fumaça de cigarro, pesticidas, certas medicações que no organismo podem se decompor em espécies reativas. Além de metais pesados incluindo ferro, cobre, cromo, mercúrio, níquel e vanádio (Birben *et al.*, 2012; Amir Aslani e Ghobadi, 2016).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio quando em níveis baixos ou moderados apresentam importância biológica, atuam em processos celulares fisiológicos fazendo parte da

regulação, sinalização e expressão gênica, além de serem produzidas por fagócitos no processo de defesa contra infecções (Amir Aslani e Ghobadi, 2016). Entretanto, em concentrações elevadas, podem causar danos a componentes celulares, como proteínas lipídeos e ao ácido desoxirribonucleico (Fang *et al.*, 2002; Pham-Huy *et al.*, 2008).

Para proteger as células e tecidos contra os efeitos tóxicos das espécies reativas organismo apresenta vários mecanismos de defesa antioxidante (Pham-Huy *et al.*, 2008). O sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em enzimático e não enzimático. O sistema enzimático é composto por diversas enzimas que podem ser classificadas em sistema de defesa primário e secundário. As enzimas que compõem o sistema primário são a glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). A SOD é uma metaloenzima que catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode ser convertido em água (H_2O) e oxigênio (O_2) pela atividade de CAT e GPx. A catalase reduz H_2O_2 em duas moléculas de água e uma de oxigênio, já a glutathione peroxidase catalisa a reação com oxidação de duas moléculas de glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG) (Birben *et al.*, 2012). A ação coordenada de CAT e GPx é importante para evitar o acúmulo de H_2O_2 , uma vez que essa espécie reativa por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss pode ser convertida no radical hidroxila (OH^\cdot), contra o qual não há sistema enzimático de defesa (Barbosa *et al.*, 2010). Além dessas outras enzimas participam da defesa primária como: a heme oxigenase-1, tioredoxinas, peroxiredoxinas e glutaredoxinas (Birben *et al.*, 2012; Amir Aslani e Ghobadi, 2016).

O sistema enzimático secundário envolve enzimas como a glutathione reductase (Grd) e glicose 6-fosfato desidrogenase. A glutathione reductase é essencial para a manutenção do ciclo oxirredução da glutathione, uma vez que essa enzima atua convertendo GSSG em GSH com a transferência de hidrogênio do NADPH (Barbosa *et al.*, 2010; Birben *et al.*, 2012). A glicose 6-fosfato desidrogenase, embora não atue neutralizando diretamente espécies reativas é essencial para a manutenção do ciclo da glutathione uma vez que regenera o NADPH (Birben *et al.*, 2012) A figura 3 representa as principais enzimas envolvidas no processo de defesa antioxidante.



Fonte: Adaptado de Barbosa *et al.*, 2010

Figura 3. Principais enzimas antioxidantes

Abreviações: O₂⁻: ânion superóxido; SOD: superóxido dismutase; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; OH⁻: radical hidroxila; CAT: catalase; O₂: oxigênio; H₂O: água; GPx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada; Grd: glutathione reductase; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser provenientes de vias metabólicas ou de fontes exógenas. Entre os antioxidantes provenientes do metabolismo estão antioxidantes de tiol (glutathione, tioredoxina, glutaredoxina) melatonina, ácido úrico, bilirrubina e proteínas quelantes metálicas. Os antioxidantes provenientes da alimentação incluem vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), vitamina A (retinol), vitaminas do complexo B, minerais (selênio, zinco, cobre, manganês, ferro), carotenóides e flavonóides (Birben *et al.*, 2012; Amir Aslani e Ghobadi, 2016).

A geração e eliminação das EROs são dois processos intimamente relacionados. O organismo possui sistemas finamente regulados para manter a produção e eliminação das EROs de forma equilibrada. Entretanto, várias perturbações podem alterar o sistema de produção e eliminação das EROs como: aumento do nível de compostos oxidantes endógenos e exógenos; esgotamento de reservas antioxidantes; diminuição na produção de enzimas antioxidantes; inativação de enzimas antioxidantes ou a associação entre um ou mais desses fatores. O rompimento no equilíbrio entre oxidantes/antioxidantes no qual, a concentração de

espécies reativas é transientemente ou cronicamente aumentada prejudicando a regulação do metabolismo celular e lavando a danos aos constituintes celulares é definido como estresse oxidativo (Holguin, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de uma dieta rica em lipídeos saturados sobre o desequilíbrio redox, a resposta inflamatória pulmonar e sistêmica de camundongos C57BL/6 submetidos ventilação mecânica.

3.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre: sobre a massa corporal e índice de adiposidade;
- II. Analisar parâmetros hematológicos e bioquímicos no sangue;
- III. Analisar e comparar o influxo de células inflamatórias no parênquima pulmonar
- IV. Avaliar o padrão histológico do parênquima pulmonar e tecido adiposo
- V. Analisar marcadores inflamatórios no homogeneizado pulmonar
- VI. Avaliar marcadores de estresse oxidativo no homogeneizado pulmonar

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados 40 camundongos C57BL/6, machos, com idade entre 7 a 8 semanas, obtidos do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram mantidos na sala de experimentação do CCA sobre condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade. Os procedimentos experimentais realizados obedeceram aos Princípios Éticos de Experimentação Animal estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP) e foram aprovados sobre o número de protocolo 2015/41.

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram inicialmente divididos em dois grupos de acordo com o tipo de dieta recebido: grupo controle (n=20) e grupo dieta (n=20). O grupo controle recebeu uma ração padrão para roedores e o grupo dieta recebeu uma ração hiperlipídica.

Todos os animais tiveram livre acesso a ração e a água durante 10 semanas. Ao término desse período, os animais foram randomicamente divididos em grupos com 10 animais: grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica (GVM), grupo dieta (GD) e grupo dieta mais ventilação mecânica (GDVM). Os animais dos grupos GC e GD foram mantidos em ventilação espontânea, os animais dos grupos GVM e GDVM foram submetidos à ventilação mecânica por 1 hora.

4.3 Composição da dieta

Os animais controles receberam a comercial NUVILAB®, já os animais do grupo dieta receberam a ração desenvolvida pelo Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC) da UFOP, com base na fórmula D12451 da empresa Research Diets. Inc (De Noronha *et al.*, 2017). A composição nutricional de ambas está descrita no quadro abaixo:

Quadro 3: Composição nutricional das dietas

	Dieta Padrão	Dieta hiperlipídica
Proteínas (%)	19,0	20,0
Carboidratos (%)	56,0	35,0
Lipídeos (%)	3,5	45,0
Total calórico (Kcal/100g)	378,0	481,0

4.4 Avaliação da massa corporal

A avaliação do ganho de massa corporal foi realizada no início do experimento e semanalmente até o término do protocolo nutricional. Os animais foram individualmente pesados em balança digital (Marte científica, série BL3200H, Marte científica e instrumentação industrial Ltda., São Paulo, Brasil)(Pena *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2016).

4.5 Ventilação mecânica

Vinte e quatro horas após o término do protocolo nutricional, os animais dos grupos GVM e GDVM foram sedados e anestesiados pela administração intraperitoneal (i.p.) de cetamina (10mg/Kg) e xilazina (8mg/Kg) e colocados em mesa cirúrgica para a realização de uma incisão mediana na região cervical anterior. A musculatura foi divulsionada com o auxílio de uma pinça hemostática, a traqueia foi exposta e realizou-se uma incisão com um cateter 20G para conexão do animal ao ventilador Minivent (Harvard Apparatus, Massachusetts, EUA).

Os animais foram ventilados no modo controlado a volume, durante uma hora de acordo com os parâmetros listados abaixo:

Quadro 4: Parâmetros ventilatórios

Parâmetros	
Volume corrente (mL/Kg)	7
Frequência respiratória (i.r.p.m.)	150
Fração inspirada de O ₂ (%)	21
PEEP (cmH ₂ O)	0

Abreviações: i.r.p.m: incursões respiratórias por minuto; PEEP: pressão positiva ao final de expiração

Após a conexão dos animais ao ventilador fez-se o bloqueio neuromuscular com a injeção intracaudal de cloreto de suxametônio (Succitrat®). A avaliação da saturação periférica e o controle da temperatura corporal foram feitas durante todo o período que os animais ficaram sob ventilação (Andrade, 2016).

4.6 Eutanásia

Ao término da ventilação mecânica, os GVM e GDVM tiveram o tórax aberto e foi realizada uma incisão no terceiro espaço intercostal para a exsanguinação. Os animais dos GC e GD foram previamente sedados e anestesiados com cetamina (130mg/Kg) e xilazina (30mg/Kg) e, posteriormente, submetidos ao mesmo procedimento de eutanásia (Murta *et al.*, 2016; Pena *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2016).

4.7 Coleta do sangue

Duas alíquotas sanguíneas de cada animal foram coletadas em tubos de polipropileno com 15µL com anticoagulante. A primeira alíquota, de aproximadamente 0,2 mL foi enviada para o Laboratório de Imunopatologia (LIMP) da UFOP para a análise dos parâmetros hematológicos: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e leucócitos totais no equipamento Bc2800vet auto Hematology Analyzer (Mindray® Bio-Medical Electronics Co. Ltda, Shenzhen, China). A segunda alíquota de sangue coletada com aproximadamente 0,8 mL, foi centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos, o plasma coletado e armazenado em freezer (-80°C) para a realização da dosagem de colesterol total e triglicérides (Soares *et al.*, 2016).

4.7.1 Esfregaço Sanguíneo

O sangue (5 μ L) foi depositado com o auxílio de uma pipeta automática em uma das extremidades de uma lâmina histológica. Com uma lâmina extensora posicionada a 45° foi realizado um movimento uniforme, deslizando sobre a lâmina histológica de modo que o sangue fosse espalhado, formando uma película ao longo de toda a lâmina. As lâminas foram coradas com o kit Panótico Rápido (Newprov, Pinhais, Paraná) através da imersão do material em três soluções distintas: solução de ciclohexadienos (0,1%), solução de azonbenzenosulfônicos (0,1%) e solução de fenotiazinas (0,1%). Posteriormente as lâminas foram lavadas em água corrente para a remoção do excesso de corantes e secadas em temperatura ambiente. As lâminas de esfregaço sanguíneo foram utilizadas para a contagem diferencial de leucócitos. Essa análise foi realizada por meio de uma contagem relativa de 100 leucócitos em cada lâmina, os quais foram diferenciados em linfócitos, monócitos e neutrófilos de acordo com a coloração, morfologia nuclear e citoplasmática.

4.7.2 Análise bioquímica no plasma

A concentração de colesterol total e triglicérides no plasma sanguíneo foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico por meio de kits comerciais específicos (Bioclin®, Quibasa). Em tubos de polipropileno pipetou-se 10 μ L de amostra e posteriormente 1mL do reagente disponível no kit, as amostras foram colocadas em Banho Maria (37°C) por 10 minutos e posteriormente lidas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 500 nm (Soares *et al.*, 2016).

4.8 Coleta do Lavado Broncoalveolar (LBA)

Imediatamente após a eutanásia, o tórax de cada animal foi aberto para a coleta do lavado broncoalveolar. O pulmão esquerdo foi clampeado, a traqueia canulada e o pulmão esquerdo lavado três vezes com 500 μ L de solução salina (0,9%). As amostras foram mantidas em gelo até o término do experimento para evitar a lise celular (Pena *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2016; Campos *et al.*, 2017).

4.8.1 Contagem total e diferencial de células do LBA

A contagem total de células do LBA foi realizada em câmara de Neubauer, para isso 10 μ L de amostra foram misturados com 30 μ L de Azul de tripan (0,04%) de modo a obter uma diluição de 1:3. Os leucócitos foram contados em quatro quadrantes diferentes da

câmara. Para a contagem diferencial de células do LBA as amostras foram centrifugadas em Cito-centrífuga (INBRAS equipamentos para saúde, SP, BR). Uma lâmina histológica e 250 µL de amostra foram colocadas na centrífuga e o material centrifugado por um minuto a 1000 rpm. Posteriormente, as lâminas foram coradas com um kit panótico rápido (Newprov, Pinhais, Paraná) como descrito em 4.7.1 Foi contado um total de 100 células por lâmina, as quais foram diferenciadas em linfócitos, macrófagos e neutrófilos de acordo com os critérios morfológicos padrão (Silva Bezerra *et al.*, 2006; Lanzetti *et al.*, 2008; Bezerra *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2016) Os procedimentos foram realizados por dois avaliadores diferentes.

4.9 Pulmões

4.9.1 Processamento tecidual

Após a coleta do LBA, o ventrículo direito foi perfundido com 20 mL solução salina (0,9%) para a remoção de sangue dos pulmões. O pulmão direito foi clampeado e o pulmão esquerdo instilado via traqueia com 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, as amostras foram colocadas em cassetes histológicos e processadas da seguinte forma: banho em álcool 70, 80 e 90 por 30 minutos em cada, seguido de dois banhos de álcool absoluto por 30 minutos, dois banhos de xilol por 30 minutos, dois banhos de parafina por 30 minutos e inclusão em parafina histológica. Após o processamento histológico e a inclusão em parafina foram feitos cortes seriados com 4µm de espessura, posteriormente corados com hematoxilina e eosina (HE) para a realização análises morfométricas, ou utilizados para a técnica de imunohistoquímica (Andrade, 2016; Pena *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2016).

4.9.2 Imunohistoquímica

Para análise da proteína HMGB1 (*High mobility group Box 1*) no núcleo de células do parênquima pulmonar foi realizada a coloração imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti-HMGB1 de acordo com a técnica padronizada no Laboratório de Neuro-imuno Patologia Experimental (NIPE) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As lâminas foram desparafinizadas em xilol (30 minutos em cada uma das três soluções) e reidratadas em soluções de álcool etílico em concentrações decrescentes: álcool absoluto I, II, III, solução a 90%, 80% e 70% por 5 minutos em cada e lavadas por 5 minutos em solução salina fosfatada (PBS - como abreviação para phosphate buffered saline). Posteriormente foi realiza a

recuperação antigênica em solução de EDTA (pH 9,0) em Banho Maria à 96°C por 20 minutos. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi realizado pela imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 volumes na concentração de 5% por duas vezes durante 15 minutos, seguida de três banhos de cinco minutos em PBS. Posteriormente os cortes foram imersos em solução a 3% de leite desnatado (MOLICO, Nestlé Brasil Ltda., Araçatuba, SP), para o bloqueio de ligações inespecíficas, seguido de bloqueio em BSA a 2% (Soro Bovino Albumina, Inlab, Brasil) e de bloqueio com Soro normal de Cabra (SNC) (Cripton Biotechnology, Brasil) na diluição de 1:20. As lâminas foram incubadas durante 30 minutos em cada solução de bloqueio e lavadas em PBS após cada período de incubação, exceto no bloqueio realizado com soro normal da cabra. Após os bloqueios, os cortes foram incubados com anticorpo primário monoclonal de coelho anti-HMGB1 [EPR3507] (Abcam, UK) na concentração de 1:250 em diluente de anticorpos (Dako/Agilent technologies, Santa Clara EUA), em câmara úmida, à temperatura de 4°C por 16 horas. Após o período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS, seguido de incubação com anticorpo secundário biotilado em câmara úmida a 37°C. Após serem novamente lavadas em três banhos de cinco minutos em PBS as lâminas foram incubadas sob as mesmas condições com o complexo estreptavidina/peroxidase (Dako LSAB - Dako/Agilent technologies, Santa Clara EUA). A ligação foi revelada com a imersão das lâminas em solução de 3,3diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂ 30 volumes diluídos em PBS, por 5 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS três vezes por 5 minutos para a interrupção da reação. Após a lavagem os cortes foram contrastados com hematoxilina de Harris, lavados, desidratados e diafanizados e as lâminas montadas com entelan. Para cada seção histológica corada com HMGB1 foi feito um controle, no qual o anticorpo primário foi suprimido (Ricci *et al.*, 2016).

4.9.3 Análises estereológicas e morfométricas do parênquima pulmonar

As análises estereológica e morfométrica do parênquima pulmonar foram realizadas nas lâminas coradas em HE e pela técnica de imunohistoquímica. Para isso, as lâminas foram fotografadas no Laboratório Multiusuário do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) da UFOP, utilizando o microscópio de luz equipados com câmara digital Leica BM5000 (Leica DFC 300 FX) acoplada ao software de captura de imagens Leica Application Suite em objetiva microscópica de 20x e 40x.

A análise de densidade de volume de septo alveolar (V_v) foi realizada em um sistema teste composto por 16 pontos e uma área de teste conhecida onde a linha proibida foi tomada como limite, para evitar a superestimação do número de estruturas. O sistema teste foi acoplado ao monitor e foram analisados 20 campos aleatórios das lâminas fotografadas em aumento de 40x, para a obtenção de amostras pulmonares uniformes e proporcionais. O número de pontos (P_p) que atingiram os septos alveolares (V_v [sa]) e os espaços alveolares (V_v [a]) foram avaliados de acordo com o número total de pontos do sistema teste (P_t). O volume de referência foi estimado pela contagem de pontos utilizando o ponto de teste do sistema (P_t). A área total de 1,94mm² foi analisada para determinar a análise volumétrica dos septos alveolares (V_v [sa]) e os espaços alveolares (V_v [a]) em seções coradas com HE (Mandarim-De-Lacerda, 2003).

A análise morfométrica dos cortes corados pela técnica de imunohistoquímica foi realizada em 20 campos aleatórios das lâminas fotografadas no aumento de 20x através do software ImageJ 1.6.0 (Wayne Rasband - National Institutes of Health, EUA) disponível no site: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>. Em cada campo contou-se o número total de núcleos e número de núcleos marcado para o anticorpo utilizado, posteriormente calculou-se a razão núcleos marcados/núcleos totais (Ricci *et al.*, 2016).

4.9.4 Homogeneizado pulmonar

Para a análise de enzimas antioxidantes, dano oxidativo e marcadores inflamatórios 100 mg do pulmão foi colocado em tubo de polipropileno com 1,5mL de tampão fosfato (KPE), e homogeneizado utilizando um homogeneizador de tecidos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 x g, o sobrenadante coletado e armazenado em freezer (-80°C)(Campos *et al.*, 2017).

4.10 Biomarcadores de estresse oxidativo e dano

4.10.1 Proteínas totais

A análise de proteínas foi realizada no sobrenadante do homogeneizado pulmonar de acordo com o método descrito por Bradford (1976). O método envolve a ligação do reagente de Bradford (Comassie brilhante azul) a proteína. A ligação do corante a proteína provoca alteração da absorbância de 465 nm para 595 nm. Para essa análise uma curva padrão foi reproduzida por meio de concentrações crescentes de albumina, para isso, 0,01g de albumina

foi dissolvida em 1 mL de água mili-Q. A partir da solução inicial, foi utilizado 200 µL adicionado de 3,8 mL de água mili-Q, de modo a obter uma solução na concentração de 0,5 mg/mL. Os demais pontos da curva padrão estão descritos no quadro:

Quadro 5: Curva padrão de albumina

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

A solução de comassie azul foi preparada na diluição de 4:1 (água mili-Q: comassie azul). Após o preparo da curva padrão e da solução de comassie azul pipetou-se em placa de 96 poços 10 µL de albumina em cada ponto da curva, em seguida foram adicionados em cada poço 2 µL de amostra do homogeneizado pulmonar e 8 µL de água mili-Q. Posteriormente, em todos os poços da placa pipetou-se 190 µL de solução de comassie azul. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas a 595 nm (Campos *et al.*, 2017).

4.10.2 Atividade da Superóxido Dismutase

A atividade de Superóxido Dismutase (SOD) foi mensurada no homogeneizado tecidual de acordo com o método descrito por Marklund e Marklund (1974). O método é baseado na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. Os reagentes de trabalho utilizados foram: fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), Pirogalol e MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]- 2,5-difenilterazolio) e Dimetilsulfóxido (DMSO). Para a realização da dosagem, fragmentos de 50 mg de tecido foram homogeneizados com 500µL tampão fosfato (pH 7,0), em seguida, centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi pipetado em placa de 96 poços seguido a adição dos reagentes como descrito no quadro abaixo:

Quadro 6: Reagentes utilizados para a análise da atividade da superóxido dismutase

	Amostra - μL	Tampão - μL	MTT (1,25 mM)- μL	Pirogalol (100 mM) - μL
Branco	*	144	6	*
Padrão	*	129	6	15
Amostra	30	99	6	15

A placa foi incubada por 5 minutos a 37°C, logo após 150 μL de DMSO foram adicionados para parar a reação. Posteriormente a placa foi lida em espectrofotômetro de placas à 570nm. Após a leitura da placa o valor de absorbância foi convertido em unidade de SOD pela subtração do valor de absorbância da amostra pelo valor do branco, seguido pela divisão desse valor pelo encontrado na subtração do padrão pelo branco. O resultado foi representado em U/mg de proteína (Campos *et al.*, 2017).

4.10.3 Atividade da Catalase

A atividade de Catalase (CAT) foi mensurada de acordo com o método descrito por Aebi (1984) a partir do decréscimo de H_2O_2 a uma absorbância de 240 nm. O método se baseia na decomposição enzimática do H_2O_2 em um intervalo de 60 segundos por espectrofotometria. Para a preparação das amostras 100mg do tecido foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10000 x g a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica.

Inicialmente foram utilizados os seguintes reagentes para o preparo do tampão fosfato: cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), os sais foram diluídos em água destilada e mantidos na geladeira. No momento da análise foi utilizado 25 mL de tampão, que foram misturados com 40 μL de peróxido de hidrogênio. Após o preparo dos reagentes foi iniciada a leitura em espectrofotômetro. O tampão com o peróxido foi alíquotado juntamente com cada amostras em cubeta de quartzo (970 μL e 30 μL , respectivamente) e lidos a 240 nm durante 60 segundos, com registros a cada 10 segundos. A atividade da catalase foi determinada pela

diminuição da absorbância a 240nm, de acordo com a Lei de Lambert Beer, onde 1 U equivale a 1 μ mol de hidrólise de H₂O₂ por minuto, por mL (Campos *et al.*, 2017).

4.10.4 Sistema glutaciona

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

Inicialmente foi preparada a curva padrão da análise. Para isso 3 mg de glutaciona reduzida foi diluída em 1 mL de água destilada e a partir dessa solução estoque foram preparados os demais pontos da curva, conforme descrito na tabela a baixo:

Quadro 7: Curva padrão para a análise de glutaciona total

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

Posteriormente, em cada poço da placa foram pipetados 10 μ L de cada solução da curva, 10 μ L das amostras para o teste ou 10 μ L de SSA 5% para o branco, como descrito no quadro. Em seguida foi adicionada a mistura de trabalho que continha tampão fosfato de potássio, glutaciona redutase e DTNB. As amostras foram incubadas por 5 minutos e em seguida a reação foi iniciada com a adição de 50 μ l de solução de NADPH. Com o início da reação, a absorbância foi imediatamente medida a 405 nm utilizando um espectrofotômetro de placa. Foram realizadas 5 leituras com intervalo de 1 minuto entre cada leitura.

Quadro 8: Reagentes utilizados na dosagem de glutatona

	Misturar e incubar por 5 minutos			Após 5 min
	Amostra (μl)	SSA 5% (μl)	Mistura de trabalho (μl)	NADPH (μl) de uso
Branco	-	10 μl	150 μl	50 μl
Curva Padrão (5 pontos)	10 μl	-	150 μl	50 μl
Amostra	10 μl	-	150 μl	50 μl

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

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

4.10.5 Análise de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio para a análise de peroxidação lipídica foi realizado de acordo com método descrito por Buege e Aust (1978). Esse método se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) se ligar a lipídeos oxidados. Para a realização da análise, 200 μL do homogeneizado tecidual (obtido em 4.9.4) adicionado de 300 μL de solução tampão (KPE) foram pipetados em tubo criogênico. Posteriormente 250 μL de solução de ácido tricloroacético (TCA 28% p/v dissolvido em ácido clorídrico), 250 μL de TBA 1% dissolvido em ácido acético 1:1 e 125 μL de butil hidróxitolueno (BHT) 5 Mm dissolvido em etanol foram adicionados. Em seguida, o tubo foi levado ao vórtex e colocado em banho-maria a 95°C por 15 minutos. Após serem resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, o material foi centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 535 nm. A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção

molar ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), seguindo a lei de Lambert Beer. O resultado foi representado em nmols/mL (Soares *et al.*, 2016).

4.10.6 Proteína Carbonilada

Espécies reativas de oxigênio podem reagir com proteínas causando modificação oxidativa de proteínas e formação de compostos carbonílicos, que podem ser detectados por métodos sensíveis. Para a determinação de proteína carbonilada foi utilizado um protocolo adaptado do método descrito por Reznick e Packer (1994). 500 μL do homogeneizado pulmonar (obtido em 4.9.4) foi colocado em tubos de polipropileno e adicionados e 500 μL de TCA 10%, misturou-se no vórtex e em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi misturado com 500 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e no escuro, por uma hora e a cada 15 minutos eram misturadas no vórtex. Ao final do período foi acrescentado 500 μL de TCA e as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartados e 1 mL da mistura de etanol/acetato de etila (1:1) foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex e novamente centrifugados, essa etapa da reação foi repetida por duas vezes. Após a segunda lavagem com a solução de etanol/acetato de etila o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de Dodecil sulfato de sódio (SDS) 6% misturou-se no vórtex e centrifugou-se à 10000 rpm por 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro a 370 nm.

A concentração de proteína carbonilada nas amostras foi determinada de acordo com a equação de Lambert Beer:

$$C = \frac{\text{Abs}}{\epsilon} \times \frac{1000000}{VA}$$

Abs = Absorbância

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

VA = volume da amostra;

C = concentração de proteína carbonilada na amostra (nmol/mL).

Para a determinação da concentração de proteína carbonilada em relação à concentração de proteínas totais utilizou-se o valor encontrado na análise de proteínas pelo método de Bradford (1976).

$$\text{Equação} = \text{Proteína carbonilada (nmol/mL)} / \text{Proteína total (mg/mL)}$$

4.11 Ensaios imunoenzimáticos do pulmão

Para as análises teciduais de CCL2, CCL5, IL-17, IL-22 e IL-10, 100 mg de tecido foi homogeneizado com 1 ml de tampão fosfato (PBS). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C, o sobrenadante foi congelado a -20°C e, posteriormente, utilizadas para análises por meio do método Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay (ELISA). Estes ensaios foram realizados utilizando kits, sendo todos os anticorpos e reagentes reconstituídos e aliqüotados de acordo com as orientações dos fabricantes e as análises foram realizadas como descrito a seguir.

Em resumo, em placas de 96 poços foram adicionados 100 µl de anticorpo monoclonal contra o peptídeo (anticorpo de captura), reconstituído em PBS, sendo estas placas incubadas por 12 horas a temperatura ambiente. Os anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS-Tween (PBS adicionado de 0,05% de Tween20) e as placas foram bloqueadas com 100 µl/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. A seguir as placas foram novamente lavadas. Foi preparada por diluição seriada uma curva padrão. As amostras foram aplicadas em um volume de 25 µl para cada poço e, a seguir, foi realizada incubação por 2 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários (anticorpo de detecção), após os poços serem devidamente lavados, foram diluídos em PBS-BSA 0,1% e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada e 100 µl de estreptoavidina ligada à peroxidase (na diluição recomendada pelo protocolo de cada kit) em PBS-BSA 0,1% foram adicionados à placa e a mesma incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. O cromógeno escolhido para revelação foi a Tetrametilbenzidina (Color Reagent B - R&D Systems, Minneapolis, USA). 5 ml do cromógeno foi adicionado a 5 ml de peróxido de hidrogênio adquirida pelo mesmo fabricante (Color reagent A - R&D Systems, Minneapolis, USA). 100 µL dessa solução foram adicionados em cada um dos poços e após vinte minutos de incubação em ausência de luz e temperatura ambiente, a reação foi bloqueada adicionando-se 100 µl de ácido sulfúrico (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 quimiocinas e interleucina presentes nas amostras foi determinada baseada na densidade

óptica obtida com a curva padrão de concentrações conhecidas dos peptídeos, analisadas pelo software SOFT max PRO 4.0 (Pena *et al.*, 2016).

4.12 Tecido adiposo

4.12.1 Índice de adiposidade

Os coxins adiposos mesentérico, retroperitoneal e epididimal foram removidos e pesados em balança de precisão para a determinação do índice de adiposidade corporal (IAC) que foi calculado de acordo com a equação (Catta-Preta *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013):

$$\text{IAC} = \frac{(\text{TAE} + \text{TAR} + \text{TAM})}{\text{Massa corporal}} \times 100$$

IAC: índice de adiposidade

TAE: tecido adiposo epididimal

TAR: tecido adiposo retroperitoneal

TAM: tecido adiposo mesentérico

4.12.2 Análise morfométrica do tecido adiposo epididimal

Aproximadamente 400 mg de tecido adiposo epididimal foi removido e fixado em formalina tamponada 10% por 48 horas, em seguida o material foi processado e incluído como descrito em 4.9.1. Para análise da área de adipócitos as seções histológicas fotografadas no Laboratório Multiusuário do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) da UFOP, utilizando o microscópio de luz equipados com câmara digital Leica BM5000 (Leica DFC 300 FX) acoplada ao software de captura de imagens Leica Application Suite em objetiva microscópica de 10x. Foram analisados 10 campos aleatórios e a média de área dos adipócitos foi obtida através da análise de 50 adipócitos por lâmina no software ImageJ 1.6.0 (Wayne Rasband - National Institutes of Health, EUA) (Pena *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2016).

4.13 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph-pad Prism 5.0. (San Diego, CA, EUA) A distribuição paramétrica dos dados foi avaliada utilizando o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram expressos em média e erro padrão da média, os dados não paramétricos foram expressos em mediana, valor mínimo e valor máximo. A análise dos dados de massa corporal foi realizada pelo teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Para a comparação dois ou mais grupos foi utilizado o teste de variância (One-way ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey, para dados não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Foi considerada como diferença significativa quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Ganho de massa corporal

O ganho de massa corporal induzido pela dieta hiperlipídica foi confirmado através pesagem semanal dos animais. Conforme a figura 4, o Grupo dieta (GD) apresentou maior massa corporal a partir da 3 semana de experimento quando comparado com o Grupo Controle (GC). A diferença de massa corporal entre os grupos manteve-se até o término do experimento.

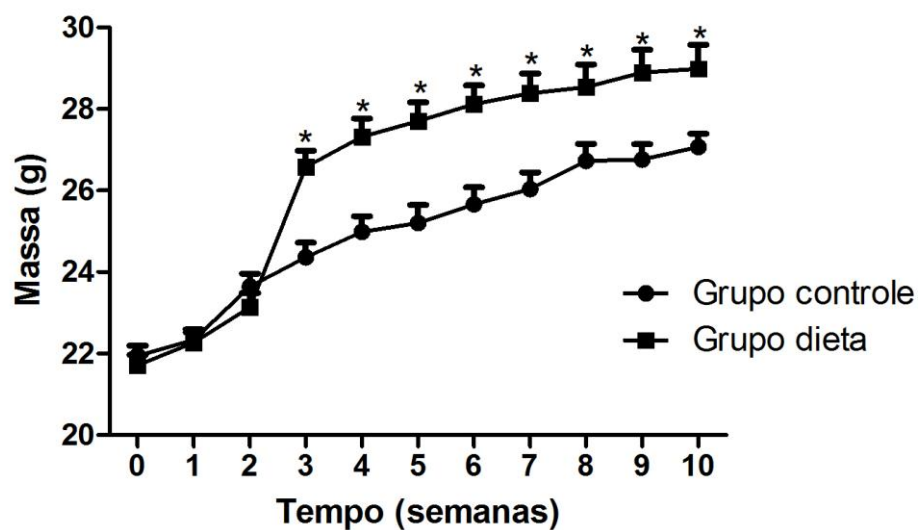


Figura 4. Ganho de massa corporal

Grupo controle: recebeu dieta com 3,5% de lipídeos; Grupo dieta; recebeu dieta com 45% de lipídeos. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n= 20). (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Análise de Variância Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

5.2 Índice de adiposidade corporal e área de adipócitos

O IAC e área de adipócitos são medidas importantes para avaliar a eficiência da dieta em induzir os animais à obesidade. Em relação ao índice de adiposidade (Figura 5A) os resultados demonstraram aumento dos depósitos de gordura nos animais dos grupos GD ($4,92 \pm 0,29$) e GDVM ($4,76 \pm 0,33$) quando comparado com GC ($3,26 \pm 0,16$) e GVM ($3,24 \pm 0,08$). Os animais que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram o IAC 48,92% maior em comparação com os animais que receberam a dieta padrão. Com relação à análise morfométrica das seções histológicas de tecido adiposo epididimal, os animais dos grupos GD ($3174 \pm 118,1 \mu\text{m}^2$) e GDVM ($3512 \pm 99,4 \mu\text{m}^2$) apresentaram maior área de adipócitos quando comparado com os grupos GC ($2035 \pm 116,2 \mu\text{m}^2$) e GVM ($2024 \pm 76,5 \mu\text{m}^2$), a figura 5B e a figura 6 demonstram que os adipócitos estão aumentados nos grupos que receberam a dieta hiperlipídica.

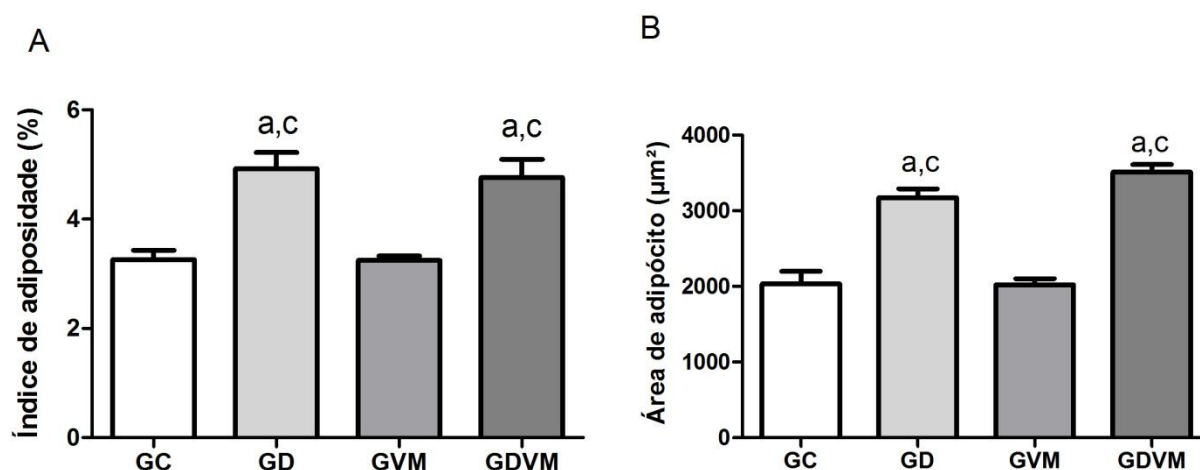


Figura 5. Índice de adiposidade e área de adipócito

(A) Índice de adiposidade corporal (B) Área de adipócitos do tecido adiposo epididimal. GC: Grupo Controle; GVM: Grupo ventilação mecânica; GD: Grupo dieta; GDVM: grupo dieta ventilação mecânica. (a) representa diferença significativa em relação à GC. (c) representa diferença significativa em relação à GVM. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n= 10). Análise de Variância One Way ANOVA seguido do pós teste de Tukey (p<0,05).

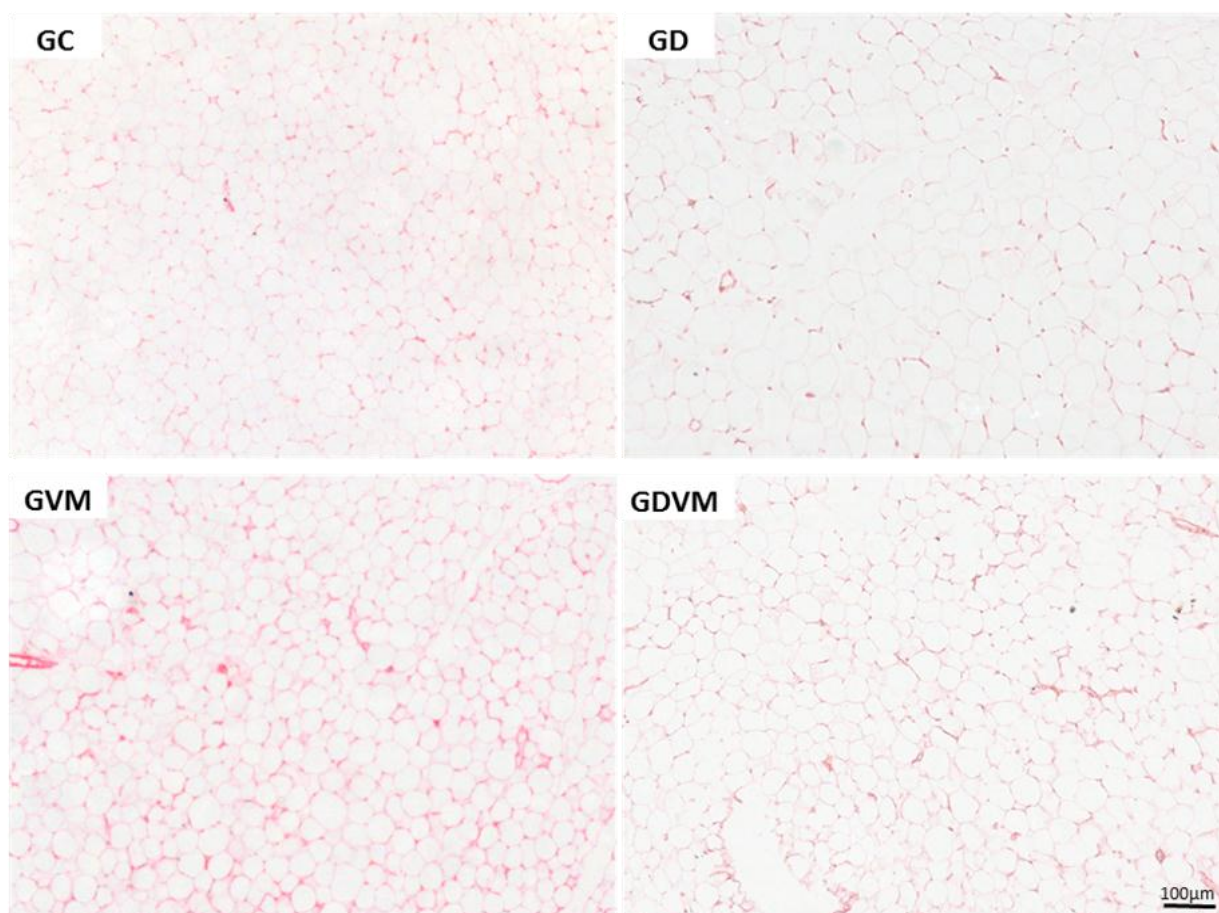


Figura 6. Fotomicrografias representativas de tecido adiposo epididimal coradas com HE. Aumento de 100x (Barra = 100µm).

GC: Grupo Controle; GVM: Grupo ventilação mecânica; GD: Grupo dieta; GDVM: grupo dieta ventilação mecânica.

5.3 Hemograma e análises bioquímicas do sangue

A concentração eritrócito, hemoglobina, hematócrito, colesterol total e triglicerídeos foram analisadas no sangue nos animais. Conforme representado na Tabela 1, em relação às concentrações de eritrócito, hemoglobina e percentual de hematócrito não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Para a análise de colesterol total, os grupos que receberam a dieta rica em lipídeos saturados apresentaram maior concentração plasmática de colesterol quando comparado com GC e GVM. Para a análise de triglicerídeos não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Tabela 1. Análise hematológica e bioquímica do sangue

	GC	GD	GVM	GDVM
Eritrócito (x10⁶/mm³)	794 ± 0,37	6,72 ± 0,40	7,54 ± 0,56	7,21 ± 0,20
Hemoglobina (g/dL)	12,91 ± 0,67	11,29 ± 0,30	12,62 ± 0,88	12,12 ± 0,37
Hematócrito (%)	38,73 ± 2,03	33,86 ± 0,92	37,87 ± 2,65	36,36 ± 1,14
Colesterol (mg/dL)	39,48 ± 5,73	85,71 ± 10,18 ^{a,c}	30,37 ± 2,88	73,94 ± 4,72 ^{a,c}
Triglicérides (mg/dL)	152,1 ± 13,46	135,00 ± 7,38	152,6 ± 8,83	145,6 ± 14,96

GC: Grupo Controle; GVM: Grupo ventilação mecânica; GD: Grupo dieta; GDVM: grupo dieta ventilação mecânica. (a) representa diferença significativa em relação à GC. (c) representa diferença significativa em relação à GVM. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n= 10). Análise de Variância One Way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey (p<0,05).

5.4 Contagem total e diferencial de células do sangue

Foram realizadas avaliações no sangue periférico dos grupos experimentais para a determinação de parâmetros inflamatórios sistêmicos (Tabela 2). No sangue periférico, os animais dos grupos GVM e GDVM apresentaram maior quantidade de leucócitos total quando comparado com GC e GD. Com relação à contagem de neutrófilos, os animais do GVM apresentaram maior quantidade de neutrófilos quando comparado com os outros três grupos experimentais, GDVM apresentou maior contagem desse tipo celular quando

comparado com GC e GD. Para a contagem de monócitos, os grupos GVM e GDVM apresentaram maior número de monócitos quando comparado com os grupos que não foram submetidos à ventilação mecânica. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais para a contagem de linfócitos.

Tabela 2. Contagem total e diferencial de células do sangue

	GC	GD	GVM	GDVM
Leucócitos (x10³/mL)	2,61 ± 0,37	2,14 ± 0,22	4,72 ± 0,35 ^{a,b}	3,90 ± 0,36 ^{a,b}
Linfócitos (x10³/mL)	2,36 ± 0,29	1,76 ± 0,20	2,15 ± 0,22	2,02 ± 0,20
Neutrófilos (x10³/mL)	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,92 ± 0,01 ^{a,b,d}	0,38 ± 0,05 ^{a,b}
Monócitos (x10³/mL)	0,19 ± 0,02	0,32 ± 0,04	1,65 ± 0,29 ^{a,b}	1,50 ± 0,20 ^{a,b}

GC: Grupo Controle; GVM: Grupo ventilação mecânica; GD: Grupo dieta; GDVM: grupo dieta ventilação mecânica. (a) representa diferença significativa em relação à GC. (b) representa diferença significativa em relação à GD (d) representa diferença significativa em relação à GDVM. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n= 10). Análise de Variância One Way ANOVA seguido do pós teste de Tukey (p<0.05).

5.5 Análise do influxo de células para o lavado broncoalveolar

A presença de células inflamatórias em cada grupo experimental foi detectada pela contagem total e diferencial de células do LBA. Os resultados encontrados demonstraram que a dieta hiperlipídica, a ventilação mecânica e a associação entre a dieta e ventilação provocaram maior recrutamento de células para o pulmão quando comparado com o grupo controle (Tabela 3). Os animais do grupo GD apresentaram maior população de macrófagos no LBA quando comparado com o grupo controle. Submeter os animais a ventilação mecânica provocou alteração no perfil de células inflamatórias, houve aumento do número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos nos grupos GVM e GDVM quando comparado com os grupos controle e dieta.

Tabela 3. Contagem total e diferencial de células do lavado broncoalveolar (LBA)

	GC	GD	GVM	GDVM
Leucócitos (x10³/mL)	83,33 ±4,41	119,00 ±5,04 ^a	204,4 ±6,47 ^{a,b}	228,0±9,31 ^{a,b,c}
Macrófagos (x10³/mL)	78,46 ±5,30	108,40 ±4,74 ^a	178,30 ±7,03 ^{a,b}	199,97±8,80 ^{a,b}
Neutrófilos (x10³/mL)	1,61 ±0,35	1,92 ±0,37	8,00 ±1,52 ^{a,b}	8,13 ±1,10 ^{a,b}
Linfócitos (x10³/mL)	3,26 ±0,52	8,68 ±1,01	18,10 ±2,30 ^{a,b}	19,90 ±2,45 ^{a,b}

GC:Grupo Controle; GVM: Grupo ventilação mecânica; GD: Grupo dieta; GDVM: grupo dieta ventilação mecânica. (a) representa diferença significativa em relação à GC. (b) representa diferença significativa em relação à GD (c) representa diferença significativa em relação à GVM.Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n= 10). Análise de Variância One Way ANOVA seguido do pós teste de Tukey (p<0.05).

5.6 Análises estereológicas do parênquima pulmonar

Nas análises estereológicas do parênquima pulmonar dos grupos experimentais não foram encontradas diferenças entre os grupos tanto para a densidade de volume de espaço aéreo alveolar quanto para a densidade de volume de septos alveolares (Figura 7 e 8).

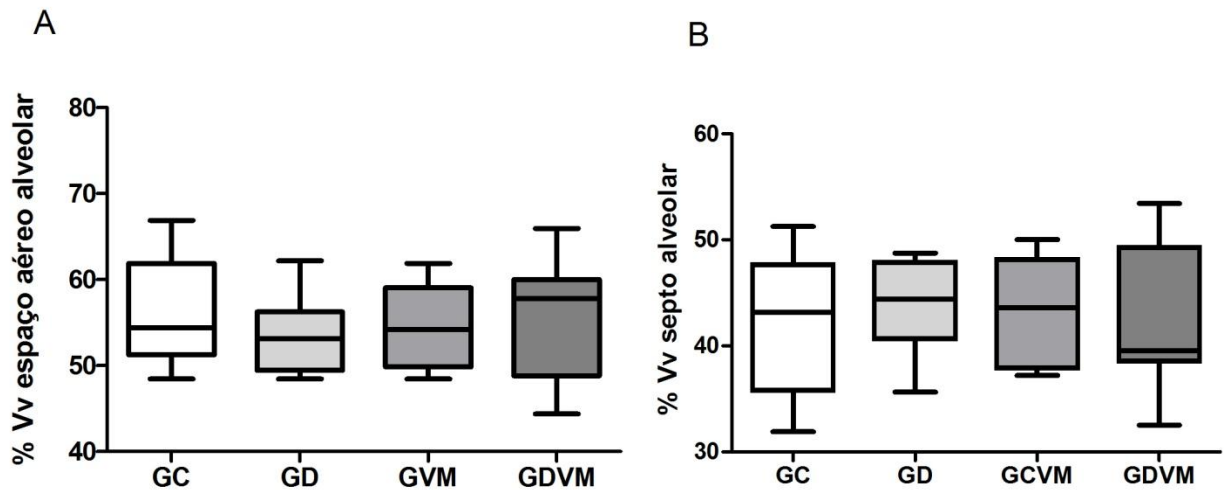


Figura 7. Análises estereológicas

(A) Densidade de volume de alvéolo (B) Densidade de volume de septo alveolar. GC: Grupo Controle; GVM: Grupo ventilação mecânica; GD: Grupo dieta; GDVM: grupo dieta ventilação mecânica. Os dados estão expressos como mediana valor mínimo e valor máximo (n= 10). Análise de Variância Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns.

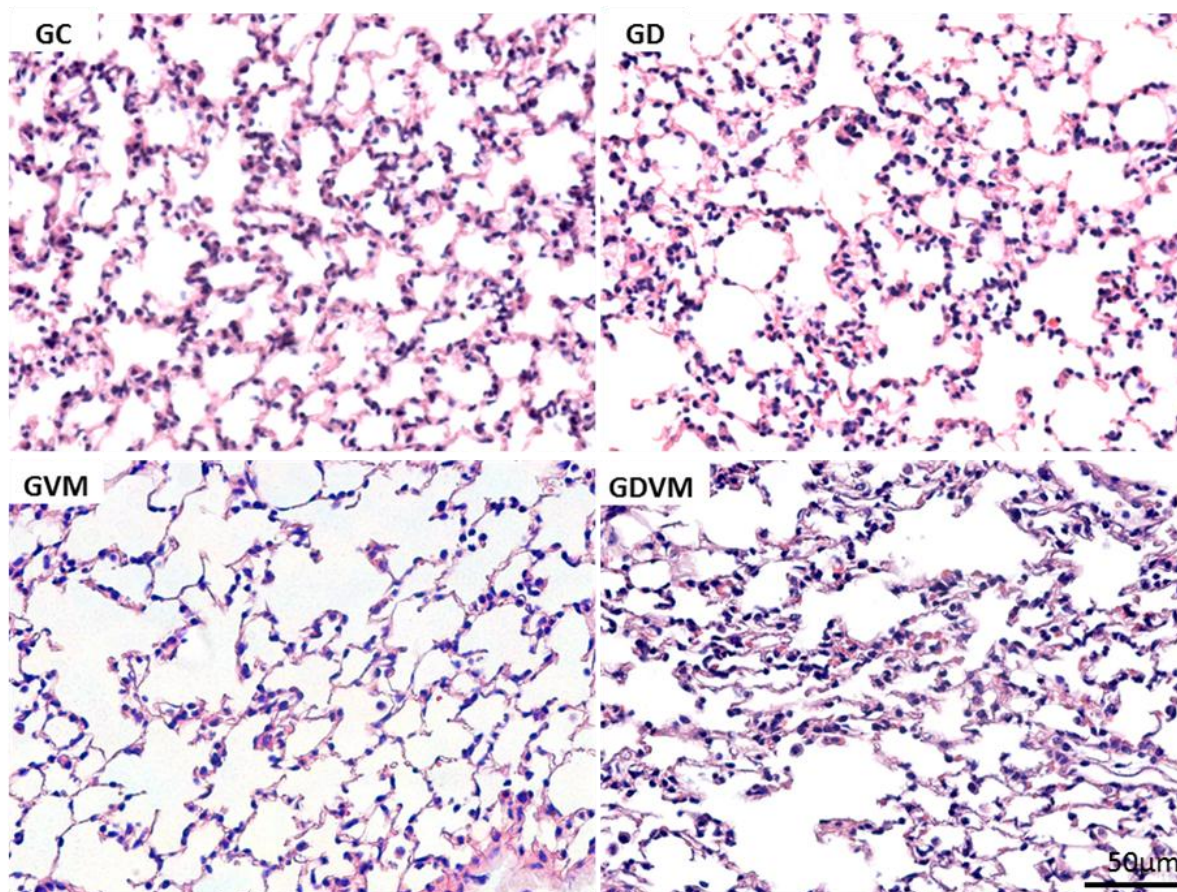


Figura 8. Fotomicrografias representativas de pulmão coradas com HE. Aumento de 400x (Barra = 50 µm).

GC: Grupo Controle; GVM: Grupo ventilação mecânica; GD: Grupo dieta; GDVM: grupo dieta ventilação mecânica.

5.7 Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica para HMGB1 demonstrou no modelo utilizado, que os animais que receberam a dieta hiperlipídica e foram ou não submetidos à VM apresentaram maior número de núcleos imunomarcados quando comparado com os grupos que receberam a dieta padrão, o que pode ser observado pela maior razão entre o número de núcleos imunomarcados para HMGB1 e núcleos não marcados para a proteína, conforme demonstrado nas figuras 9 e 10.

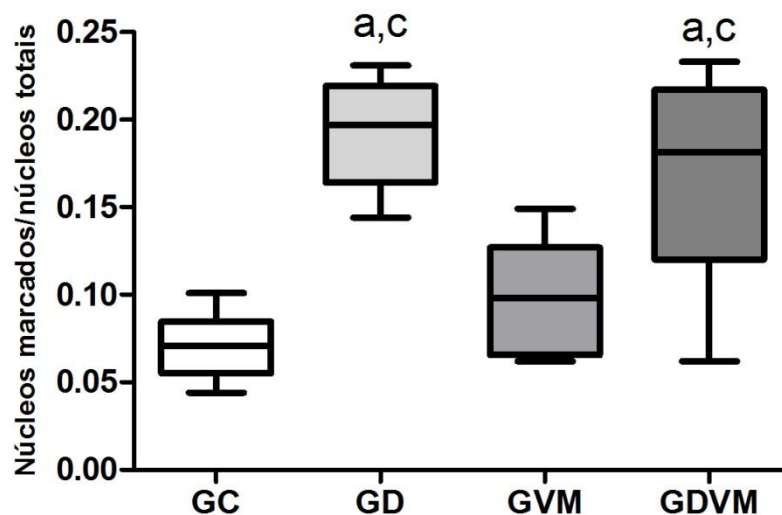


Figura 9. Razão núcleos marcados núcleos totais

GC: Grupo Controle; GVM: Grupo ventilação mecânica; GD: Grupo dieta; GDVM: grupo dieta ventilação mecânica. (a) representa diferença significativa em relação à GC. (c) representa diferença significativa em relação à GVM. Os dados estão expressos como mediana, valor mínimo e valor máximo (n= 10). Análise de Variância Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns.

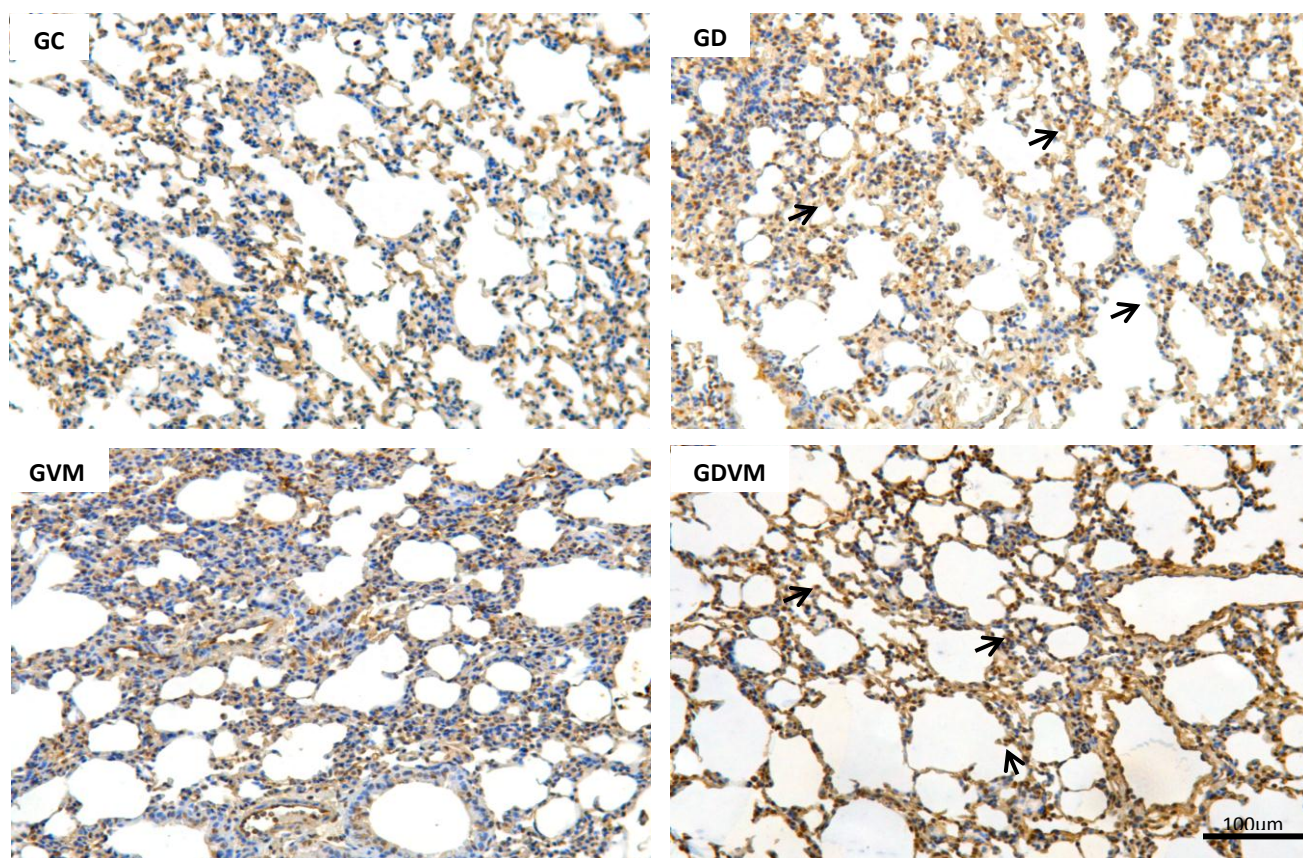


Figura 10. Fotomicrografias representativas de pulmão coradas pela técnica de imunohistoquímica para HMGB1. Aumento de 200x (Barra = 100 µm) As setas apontam para núcleos marcados.

GC: Grupo Controle; GVM: Grupo ventilação mecânica; GD: Grupo dieta; GDVM: grupo dieta ventilação mecânica.

5.8 Ensaio imunoenzimáticos para marcadores inflamatórios

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados no homogeneizado pulmonar para determinar os níveis dos marcadores inflamatórios CCL2, CCL5, IL-17, IL-22 e IL-10. Os resultados demonstraram (Tabela 4) que os animais dos grupos submetidos à ventilação mecânica apresentaram maior concentração de CCL2 e IL-22 e menor concentração de IL-17 e IL-10 no homogeneizado pulmonar quando comparado com os grupos GC e GD. Para a análise de CCL5, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

Tabela 4. Marcadores inflamatórios no pulmão

	GC	GD	GVM	GDVM
CCL2 (pg/mL)	536,6 ± 95,15	446,7 ± 108,2	1896 ± 273,9 ^{a,b}	1465 ± 237,6 ^{a,b}
CCL5 (pg/mL)	334,4 ± 56,37	176,4 ± 30,36	258,8 ± 69,23	316,5 ± 39,74
IL-17 (pg/mL)	1065 ± 33,61	1060 ± 31,40	790,9 ± 26,78 ^{a,b}	884,2 ± 52,74 ^{a,b}
IL-22 (pg/mL)	185,8 ± 38,4	207,6 ± 50,18	753,0 ± 96,97 ^{a,b}	619,9 ± 95,65 ^{a,b}
IL-10 (pg/mL)	3543 ± 150,70	3367 ± 99,34	2436 ± 33,12 ^{a,b}	2820 ± 67,87 ^{a,b}

GC: Grupo Controle; GVM: Grupo ventilação mecânica; GD: Grupo dieta; GDVM: grupo dieta ventilação mecânica. (a) representa diferença significativa em relação à GC. (b) representa diferença significativa em relação à GD. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n= 10). Análise de Variância One Way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey (p<0.05).

5.9 Biomarcadores do estresse oxidativo

A avaliação do dano na membrana celular em sua porção lipídica foi mensurada através da formação de TBARS e a oxidação de proteínas através da análise de proteína carbonilada (Tabela 5). Os resultados demonstraram que a peroxidação lipídica foi maior no grupo GVM quando comparado com GC, GD e GDVM. A oxidação proteica foi maior nos dois grupos submetidos à VM quando comparado com os grupos GC e GD. Além disso,

foram avaliadas a atividade das enzimas SOD, CAT e sistema glutaciona. Os resultados demonstraram maior atividade da enzima SOD nos grupos GVM e GDVM quando comparado com o controle. Em relação à atividade da CAT, o grupo dieta apresentou uma menor atividade da enzima quando comparado com o grupo controle, os grupos GVM e GDVM apresentaram menor atividade de catalase quando comparado com GC e GD. Conforme demonstrado na tabela 5, a razão glutaciona reduzida/glutaciona oxidada (GSH/GSSG) foi menor no grupo GVM quando comparado com o grupo controle.

Tabela 5. Biomarcadores do estresse oxidativo

	GC	GD	GVM	GDVM
SOD (U/mg ptn)	23,33 ± 1,98	28.83 ± 3,60	43,33 ± 7,18 ^a	37,32 ± 2,19 ^a
CAT (U/mg ptn)	1,01 ± 0,06	0,57 ± 0,07 ^a	0,19 ± 0,02 ^{a,b}	0,13 ± 0,01 ^{a,b}
GSH/GSSG (nmol/mL)	6,38 ± 1,64	5,47 ± 0,60	1,97 ± 0,18 ^a	5,05 ± 1,52
TBARS (nmol/mg ptn)	2,42 ± 0,27	2,16 ± 0,21	5,85 ± 1,11 ^{a,b,d}	2,77 ± 0,32
PTN carbonilada (nmol/mg ptn)	4,74 ± 0,89	3,45 ± 0,37	14,20 ± 1,64 ^{a,b}	18,46 ± 4,34 ^{a,b}

GC: Grupo Controle; GVM: Grupo ventilação mecânica; GD: Grupo dieta; GDVM: grupo dieta ventilação mecânica. (a) representa diferença significativa em relação à GC. (b) representa diferença significativa em relação à GD (d) representa diferença significativa em relação à GDVM. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n= 10). Análise de Variância One Way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey (p<0.05)

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos os efeitos da dieta hiperlipídica e da ventilação mecânica sobre a resposta inflamatória e desequilíbrio redox. A dieta hiperlipídica levou ao ganho de peso, aumento do índice de adiposidade corporal e da área de adipócitos. Além disso, o consumo da ração rica em lipídeos saturados promoveu o aumento da expressão da proteína HMGB1 no parênquima pulmonar. A ventilação mecânica e sua associação com a obesidade levaram ao recrutamento de células inflamatórias para o pulmão, aumento da produção de citocinas inflamatórias e promoveu o estresse oxidativo.

Estudos demonstraram que a alimentação com uma dieta rica em lipídeos saturados favorece o desenvolvimento da obesidade e de doenças associadas à obesidade (Fernandes-Santos *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2010). Em nosso estudo os animais que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram maior massa corporal quando comparado com os animais controle. Essa dieta tem sido utilizada em modelos experimentais para a indução da obesidade e conforme descrito por Winzell e Ahre'n (2004) e por Van der Heijden *et al.*(2015) promove o ganho de massa corporal. O aumento de massa corporal, nesses animais, está diretamente relacionado com o acréscimo no IAC e com a maior área de adipócitos, visto que o consumo calórico excessivo está associado ao armazenamento da energia excedente no tecido adiposo sob a forma de lipídeos o que leva a expansão do mesmo (Ferreira *et al.*, 2014).

A composição da dieta ofertada em modelos experimentais influencia diretamente no desenvolvimento de doenças associadas à obesidade, pois os nutrientes agem como sinalizadores celulares (Enos *et al.*, 2013; Kakimoto e Kowaltowski, 2016). O percentual de carboidratos e lipídeos consumidos tem um papel determinante na composição de lipídeos circulantes e de membrana (Sirjani *et al.*, 2014). Nossos resultados demonstram um aumento na concentração de colesterol plasmático nos animais que receberam a dieta com 45% de lipídeos saturados. Estudos anteriores que demonstraram o aumento de colesterol plasmático em modelos experimentais utilizando uma dieta rica em lipídeos (Martins *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012). Com relação à análise da concentração de triglicerídeos plasmáticos, não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais, esse resultado diverge de estudos prévios desenvolvidos de Martins *et al.*(2010) e Costa *et al.*(2012). Acreditamos que os resultados encontrados previamente discordam do encontrado neste estudo devido a diferenças nos modelos experimentais. Além disso, de acordo com Wang *et al.* (2012)

camundongos C57BL/6 são propensos ao desenvolvimento obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipertensão, mas não à hipertrigliceridemia.

A obesidade é caracterizada pelo aumento de massa corporal e também por alterações inflamatórias sistêmicas e locais, com aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias. Nesse contexto o papel da proteína HMGB1 tem sido estudado. Em nosso estudo os animais que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram maior número de núcleos imunomarcados para HMGB1. Gunasekaran *et al.* (2013) utilizando adipócitos de indivíduos obesos e eutróficos demonstraram que a obesidade está relacionada com o aumento da expressão de HMGB1 e de citocinas. Montes *et al.* (2015) em um modelo experimental no qual os animais foram submetidos a uma dieta obesogênica e tratamento com um anticorpo anti-HMGB1 houve uma redução da resposta inflamatória e modificação da composição corporal dos animais tratados. Não existem estudos publicados que demonstrem em modelo de obesidade essa proteína nos pulmões, entretanto, a maior imunomarcação encontrada em nosso estudo pode estar relacionada com o estado inflamatório crônico e sistêmico causado pela obesidade, bem como pode estar relacionada com o papel da HMGB1 no desenvolvimento da obesidade (Montes *et al.*, 2015).

Tanto a obesidade quanto a ventilação mecânica podem gerar processos inflamatórios locais e sistêmicos. Assim, para avaliar se a dieta hiperlipídica e/ou a ventilação mecânica poderiam gerar um influxo celular foram determinadas a quantidade total e diferencial de células do sangue e do lavado broncoalveolar (LBA). Por meio dos nossos resultados foi possível avaliar que tanto a dieta quanto a VM provocaram resposta inflamatória pulmonar e sistêmica.

Adicionalmente a fim de caracterizar o influxo celular, as células foram fenotipicamente avaliadas. No grupo que recebeu a dieta rica em lipídeos foi observado um aumento da contagem total, decorrente do recrutamento de macrófagos para o espaço alveolar. Nossos resultados se assemelham aos encontrados por Tashiro *et al.* (2017), que observaram recrutamento de macrófagos para o LBA de animais alimentados com uma dieta rica em lipídeos. Nós acreditamos que o recrutamento desse tipo celular possa ser explicado pelo fato de os macrófagos representarem reguladores fundamentais da resposta imune e da inflamação na obesidade, estudos prévios demonstraram o recrutamento de macrófagos e resposta inflamatória em outros tecidos como tecido adiposo, fígado e músculo estriado esquelético. (Mcnelis e Olefsky, 2014).

Nos grupos que foram submetidos à ventilação mecânica houve um aumento na contagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos no lavado broncoalveolar e um aumento de monócitos e neutrófilos no sangue quando comparado com animais que foram mantidos em ventilação espontânea. Alguns estudos prévios demonstraram que os macrófagos estão envolvidos na fase inicial da lesão pulmonar, seja pela produção de mediadores inflamatórios ou por mudanças na função de barreira (Frank *et al.*, 2006; Eyal *et al.*, 2007; Woods *et al.*, 2015). Possivelmente, o recrutamento de macrófagos para o sítio da inflamação alterou a permeabilidade alveolar o que resultou no recrutamento de neutrófilos para o pulmão. A presença de neutrófilos no espaço aéreo é uma característica da lesão pulmonar em animais e humanos, por que essas são as primeiras células do sistema imune a serem recrutadas para o local da inflamação (Grommes e Soehnlein, 2011). Após a ativação, os neutrófilos migram do interstício para o espaço alveolar. A ativação e migração de neutrófilos da circulação para os alvéolos são considerados passos importantes no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda (Grommes e Soehnlein, 2011). Choudhury *et al.*(2004), Ding *et al.*(2013) e Yildiz *et al.*(2015) observaram o recrutamento de neutrófilos para o LBA em animais submetidos à VM com alto volume corrente e por longo período de tempo. Nossos resultados divergem da literatura, uma vez que demonstramos a ventilação mecânica mesmo quando utilizada em que animais sem lesão pulmonar prévia, ventilados com o volume corrente fisiológico e por curto período, promove lesão tecidual e resposta inflamatória local. Além disso, assim como observado por Chess *et al.*(2010) nós observamos o recrutamento de linfócitos para o pulmão de animais submetidos à ventilação mecânica.

Ding *et al.* (2013) observaram edema intersticial e infiltração de células nos pulmões de camundongos submetidos a ventilação mecânica e tratamento com LPS. Nagato *et al.* (2012) em um modelo de exposição a altas concentrações de oxigênio observaram alterações na histoarquitetura pulmonar de animais expostos ao oxigênio por longo período. Apesar de nossos resultados mostrarem uma resposta inflamatória local, não foram encontradas alterações na histoarquitetura pulmonar, acreditamos que divergem de trabalhos anteriores, pois em nosso estudo utilizamos uma estratégia de ventilação protetora, uma fração inspirada de oxigênio similar a do ar ambiente e os animais foram mantidos em ventilação mecânica por curto período de tempo.

Nesse estudo, foi realizado o ensaio imunoenzimático a fim de analisar o envolvimento das quimiocinas CCL2 e CCL5 e da interleucinas 10 (IL-10), 17 (IL-17) e 22

(IL-22) no processo inflamatório pulmonar. A interleucina 17 é produzida principalmente por linfócitos Th17, mas outras células do sistema imune inato e adaptativo produzem essa interleucina como linfócitos $\gamma\delta$ T, células iNKT, além de neutrófilos e mastócitos durante infecções (Eyerich *et al.*, 2017). A IL-17 é uma interleucina com característica pró-inflamatória que está envolvida com o recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação pelo fato de estimular outros genes inflamatórios como CXCL1, CXCL2, TNF e IL-6. A interleucina 22 é produzida por diversos tipos celulares: células CD4+ (Th1, Th17 e Th22) células natural killer (NK), CD11c+ e células mielóides (Sonnenberg *et al.*, 2010; Rutz *et al.*, 2013). Diferente da IL-17 a IL-22 pode apresentar funções anti ou pró-inflamatória. Na presença de IL-17, a IL-22 promove inflamação nas vias aéreas, entretanto na ausência dessa citocina, a interleucina 22 pode apresentar um papel protetor das vias aéreas, o que demonstra um sinergismo entre as duas citocinas (Rutz *et al.*, 2013). Em estudos desenvolvidos por Wu *et al.* (2017) Hoegl *et al.* (2011) a administração de IL-22 mostrou efeitos protetores em modelos de lesão pulmonar. Em nosso estudo, encontramos uma diminuição de IL-17 nos grupos submetidos à VM, por outro lado nesses grupos há um aumento de IL-22. Nossos resultados sugerem que nesse modelo de ventilação mecânica a interleucina 22 exerça ação protetiva, uma vez está aumentada em grupos nos quais a concentração de IL-17 está diminuída. A IL-22 pode estar relacionada com o recrutamento de células do sistema imune inato para proteção contra agentes invasivos (Aujla *et al.*, 2008), levando ao aumento da produção de quimiocinas (Ikeuchi *et al.*, 2005).

Em nosso estudo a concentração de CCL2 no homogeneizado pulmonar foi maior nos grupos submetidos à ventilação quando comparado com os grupos mantidos em ventilação espontânea. As quimiocinas são moléculas tróficas, ou seja, são mediadores do extravasamento de leucócitos para regular o processo inflamatório e migração direcional de células para tecidos infectados (Navratilova, 2006). Altemeier *et al.* (2004) em um modelo experimental de ventilação mecânica utilizando volume corrente moderado observou um aumento de CCL2 nos animais ventilados.. Ikeuchi *et al.* (2005) observaram que a IL-22 induziu a proliferação e expressão de CCL2 na artrite reumatoide. Nossos resultados sugerem que IL-22 a fim de reparar um possível dano tecidual causado pelo mecanismo anti-fisiológico da VM induziu a um aumento na produção de CCL2. O aumento do nível dessa quimiocina está diretamente relacionados com o recrutamento de monócitos para o sítio da inflamação (Baier *et al.*, 2004).

A IL-10 é uma interleucina que apresenta propriedades anti-inflamatórias devido a sua capacidade de diminuir ou inibir a síntese ou secreção de fatores inflamatórios, limitando assim a resposta inflamatória e prevenindo lesões pulmonares (Hawwa *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2015). Lee e Kim (2011) observaram uma redução de IL-10 e aumento de citocinas inflamatórias em células alveolares expostas a altas concentrações de oxigênio. Hawwa *et al.*(2011) em um estudo com células e Hoegl *et al.*(2009) em um modelo murino de lesão pulmonar induzida pelo ventilador observaram que o pré-tratamento com IL-10 reduziu a produção de citocinas inflamatória e lesão pulmonar. Boherer *et al.* (2010) observaram uma redução de IL-10 em recém-nascidos submetidos à VM. Em nosso estudo, considerando os achados anteriores é possível que nos animais submetidos a ventilação espontânea os níveis de IL-10 tem um efeito regulatório para inibir a resposta inflamatória, porém quando os animais são submetidos a VM o processo inflamatório agudo levou a uma redução na produção da interleucina, o que pode contribuir para o desenvolvimento de lesão pulmonar.

A VM assim como a obesidade está relacionada ao desenvolvimento de processos inflamatórios. Observamos um aumento do número de células inflamatórias no parênquima pulmonar no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica e nos grupos submetidos à ventilação mecânica e, sabe-se que macrófagos e neutrófilos contribuem para o aumento da produção de espécies reativas e para o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Reddy *et al.* (2007) relataram que em estudos com culturas de células epiteliais e células endoteliais pulmonares o estiramento cíclico levou ao aumento da produção das EROs, sugerindo que as espécies reativas podem contribuir para o desenvolvimento da lesão pulmonar. Em nosso estudo, a fim de avaliar o dano oxidativo causado pela ventilação e obesidade analisamos a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas nos grupos experimentais. O grupo submetido apenas à VM apresentou maior nível de peroxidação lipídica quando comparado com os demais grupos, Kavazis *et al.* (2009) demonstraram um aumento significativo de produtos de peroxidação lipídica em animais ventilados por longo período demonstrando que a ventilação mecânica leva ao estresse oxidativo. Em adição, nos dois grupos submetidos à VM foi observado um aumento da oxidação de proteínas quando comparado com os grupos que não foram submetidos. Chacon-Cabrera *et al.*(2014), sugerem que a VM leva ao dano oxidativo apenas quando utilizada com um volume corrente não fisiológico. Nossos resultados divergem da literatura, uma vez que demonstramos que em animais sem lesão pulmonar prévia à ventilação mecânica leva a uma lesão pulmonar e ao estresse oxidativo.

Os oxidantes produzidos por células inflamatórias desempenham um papel importante na lesão epitelial e podem induzir uma lesão pulmonar aguda (Matthay e Zemans, 2011). Para contrabalançar as espécies reativas os pulmões apresentam um sistema de defesa antioxidante que inclui as enzimas SOD, CAT e GPx (Pham-Huy *et al.*, 2008). Em nosso estudo, os grupos que foram submetidos à VM apresentaram um aumento na atividade de SOD. A superóxido dismutase é uma importante enzima antioxidante, ela protege as células contra danos causados pelo ânion superóxido, uma vez que catalisa a reação de dismutação de radicais superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Birben *et al.*, 2012). A VM assim como sua associação com a obesidade promoveu o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o pulmão, com mencionado anteriormente. A infiltração de células inflamatórias no pulmão pode resultar no aumento dos níveis de espécies reativas e oxigênio, e as enzimas antioxidantes são essenciais para atenuar a reposta gerada pelas EROs. Dessa forma, é possível dizer que o processo inflamatório oriundo da VM e da associação entre a ventilação e a obesidade são responsáveis pelo desequilíbrio da SOD. O desequilíbrio da SOD desencadeou também o desequilíbrio de outros sistemas relacionados à homeostase redox do pulmão. No grupo submetido à VM houve uma redução na razão glutatona reduzida/glutaciona oxidada, demonstrando indiretamente um aumento da atividade da glutatona peroxidase (GPx). A GPx é uma enzima antioxidante responsável reduzir o peróxido de hidrogênio em água através da oxidação de duas moléculas de glutatona (Birben *et al.*, 2012). Murta *et al.* (2016) demonstraram uma redução na razão GSH/GSSG na presença do desequilíbrio redox. Reddy *et al.* (2007) relatou que a exposição de células epiteliais ao estiramento cíclico causou uma redução significativa na razão GSH/GSSG.

Adicionalmente, observamos uma diminuição na atividade de catalase no grupo dieta quando comparado com o grupo controle e nos dois grupos submetidos à VM, a atividade da enzima foi menor quando comparado com GC e GD. A catalase é uma das enzimas responsáveis por reduzir o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Birben *et al.*, 2012). Ashakumary e Vijayammal (1996), Vuković *et al.* (2014) observaram uma redução da atividade de catalase no pulmão e fígado de ratos alimentados com uma dieta rica lipídeos. O resultado encontrado em nosso estudo corrobora com os trabalhos anteriores, acreditamos o consumo da dieta rica em lipídeos saturados sistemicamente alterou o metabolismo de oxigênio aumentando a produção de espécies reativas o que levou a uma depleção das reservas de catalase (Fernández-Sánchez *et al.*, 2011). Marín-Corral *et al.* (2010) em animais ventilados com moderado volume corrente observaram uma redução da atividade de catalase.

Nesse contexto, é possível que a catalase atue inicialmente convertendo o peróxido de hidrogênio em água tanto na obesidade quanto na VM, de forma que o sistema glutathiona atue em processos mais intensos de produção de espécies reativas onde provavelmente ocorra uma saturação da atividade de catalase.

7. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a associação da obesidade e da ventilação mecânica promoveu infamação e estresse oxidativo pulmonar em camundongos adultos.

8. FINANCIAMENTO

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx – ICEB), Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC – ICEB), Laboratório de Imunobiologia da Inflamação (LABIIN – ICEB), Laboratório de bioquímica metabólica (LMB – ICEB), Laboratório de Imunopatologia (LIMP - NUPEB), Laboratório de Neuroimuno patologia (ICB – UFMG), com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (“Edital 01/2016 - Demanda Universal” Processo N.: CDS - APQ-00823-16), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

9. REFERÊNCIAS

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

ALTEMEIER, W. A. et al. Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 287, n. 3, p. L533-42, Sep 2004. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15145786> >.

AMIR ASLANI, B.; GHOBADI, S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. **Life Sci**, v. 146, p. 163-73, Feb 2016. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26792059> >.

ANDRADE, M. C. **A resposta inflamatória pulmonar e o estresse oxidativo induzidos pela ventilação mecânica são dependentes da Pressão Positiva ao Final da Expiração.** (Dissertação). Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: 1-64 p. 2016.

ANZUETO, A. et al. Influence of body mass index on outcome of the mechanically ventilated patients. **Thorax**, v. 66, n. 1, p. 66-73, Jan 2011. ISSN 1468-3296. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980246> >.

ASHAKUMARY, L.; VIJAYAMMAL, P. L. Effect of nicotine on antioxidant defence mechanisms in rats fed a high-fat diet. **Pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 153-8, Mar 1996. ISSN 0031-7012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8849484> >.

ASHBURN, D. D.; DEANTONIO, A.; REED, M. J. Pulmonary system and obesity. **Crit Care Clin**, v. 26, n. 4, p. 597-602, Oct 2010. ISSN 1557-8232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20970044> >.

AUJLA, S. J. et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. **Nat Med**, v. 14, n. 3, p. 275-81, Mar 2008. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18264110> >.

BAIER, R. J. et al. CC chemokine concentrations increase in respiratory distress syndrome and correlate with development of bronchopulmonary dysplasia. **Pediatr Pulmonol**, v. 37, n. 2, p. 137-48, Feb 2004. ISSN 8755-6863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14730659> >.

BANDEIRA, A. C. et al. Lycopene pretreatment improves hepatotoxicity induced by acetaminophen in C57BL/6 mice. **Bioorg Med Chem**, v. 25, n. 3, p. 1057-1065, Feb 2017. ISSN 1464-3391. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28031152> >.

BARBOSA, K. B. F. B. et al. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios** Campinas: Revista de Nutrição. 23: 629-643 p. 2010.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. [Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends]. **Cad Saude Publica**, v. 19 Suppl 1, p. S181-91, 2003. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12886448> >.

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> >.

BEZERRA, F. S. et al. Long-term exposure to cigarette smoke impairs lung function and increases HMGB-1 expression in mice. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 177, n. 2, p. 120-6, Jul 2011. ISSN 1878-1519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21457800> >.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, v. 5, n. 1, p. 9-19, Jan 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23268465> >.

BOHRER, B. et al. Mechanical ventilation of newborns infant changes in plasma pro- and anti-inflammatory cytokines. **J Pediatr**, v. 156, n. 1, p. 16-9, Jan 2010. ISSN 1097-6833. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783005> >.

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> >.

BRASIL. **Vigitel Brasil 2015 Saúde Suplementar : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito**

telefônico. Brasília: Ministério da Saúde: 170 p. 2017.

BRAY, G. A. et al. Overweight and obesity: the pathogenesis of cardiometabolic risk. **Clin Cornerstone**, v. 9, n. 4, p. 30-40; discussion 41-2, 2009. ISSN 1873-4480. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789062> >.

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. D. et al. The antioxidant and anti-inflammatory properties of lycopene in mice lungs exposed to cigarette smoke. **J Nutr Biochem**, v. 48, p. 9-20, Jun 2017. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28651168> >.

CARVALHO, C. R. R. **Ventilação Mecânica Volume I - Básico**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000. 459.

CARVALHO, C. R. R.; TOUFEN JUNIOR, C.; FRANCA, S. A. **III Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica**. Ventilação mecânica: princípios, análise gráfica e modalidades ventilatórias: Jornal Brasileiro de Pneumologia. Supl 2: S54 - S70 p. 2007.

CATTA-PRETA, M. et al. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. **Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 212-9, Feb 2012. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21872438> >.

CHACON-CABRERA, A. et al. Influence of mechanical ventilation and sepsis on redox balance in diaphragm, myocardium, limb muscles, and lungs. **Transl Res**, v. 164, n. 6, p. 477-95, Dec 2014. ISSN 1878-1810. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25168016> >.

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> >.

CHUNG, S. Body mass index and body composition scaling to height in children and adolescent. **Ann Pediatr Endocrinol Metab**, v. 20, n. 3, p. 125-9, Sep 2015. ISSN 2287-1012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26512347> >.

COSTA, M. V. et al. Diets rich in saturated fat and/or salt differentially modulate atrial natriuretic peptide and renin expression in C57BL/6 mice. **Eur J Nutr**, v. 51, n. 1, p. 89-96, Feb 2012. ISSN 1436-6215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499941> >.

DE NORONHA, S. R. et al. High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. **Behav Brain Res**, v. 316, p. 38-46, Jan 01 2017. ISSN 0166-4328.

DING, J.; CUI, X.; LIU, Q. Emerging role of HMGB1 in lung diseases: friend or foe. **J Cell Mol Med**, v. 21, n. 6, p. 1046-1057, Jun 2017. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28039939> >.

DING, N. et al. Mechanical ventilation enhances HMGB1 expression in an LPS-induced lung injury model. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74633, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24058610> >.

DRIES, D. J. Mechanical Ventilation: History and Harm. **Air Med J**, v. 35, n. 1, p. 12-5, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 1532-6497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26856653> >.

ENOS, R. T. et al. Influence of dietary saturated fat content on adiposity, macrophage behavior, inflammation, and metabolism: composition matters. **J Lipid Res**, v. 54, n. 1, p. 152-63, Jan 2013. ISSN 1539-7262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103474> >.

EYAL, F. G.; HAMM, C. R.; PARKER, J. C. Reduction in alveolar macrophages attenuates acute ventilator induced lung injury in rats. **Intensive Care Med**, v. 33, n. 7, p. 1212-8, Jul 2007. ISSN 0342-4642. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17468847> >.

EYERICH, K.; DIMARTINO, V.; CAVANI, A. IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. **Eur J Immunol**, v. 47, n. 4, p. 607-614, Apr 2017. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28295238> >.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872-9, Oct 2002. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12361782> >.

FERNANDES-SANTOS, C. et al. Rosiglitazone aggravates nonalcoholic Fatty pancreatic disease in C57BL/6 mice fed high-fat and high-sucrose diet. **Pancreas**, v. 38, n. 3, p. e80-6, Apr 2009. ISSN 1536-4828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19214135> >.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 5, p. 3117-32, 2011. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21686173> >.

FERRANTE, A. W. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. **J Intern Med**, v. 262, n. 4, p. 408-14, Oct 2007. ISSN 0954-6820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875176> >.

FERREIRA, A. V. et al. Distinct metabolic pathways trigger adipocyte fat accumulation induced by high-carbohydrate and high-fat diets. **Nutrition**, v. 30, n. 10, p. 1138-43, Oct 2014. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24976420> >.

FRANK, J. A. et al. Alveolar macrophages contribute to alveolar barrier dysfunction in ventilator-induced lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 291, n. 6, p. L1191-8, Dec 2006. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16877636> >.

FRIEDMAN, J. M. Obesity: Causes and control of excess body fat. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 340-2, May 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19458707> >.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 415-45, 2011. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219177> >.

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> >.

GUNASEKARAN, M. K. et al. Inflammation triggers high mobility group box 1 (HMGB1) secretion in adipose tissue, a potential link to obesity. **Cytokine**, v. 64, n. 1, p. 103-11, Oct 2013. ISSN 1096-0023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23938155> >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford Clarendon Press 2006

HAWWA, R. L. et al. IL-10 inhibits inflammatory cytokines released by fetal mouse lung fibroblasts exposed to mechanical stretch. **Pediatr Pulmonol**, v. 46, n. 7, p. 640-9, Jul 2011. ISSN 1099-0496. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21337733> >.

HOEGL, S. et al. Protective properties of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 44, n. 3, p. 369-76, Mar 2011. ISSN 1535-4989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463292> >.

HOEGL, S. et al. Inhaled IL-10 reduces biotrauma and mortality in a model of ventilator-induced lung injury. **Respir Med**, v. 103, n. 3, p. 463-70, Mar 2009. ISSN 1532-3064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19006658> >.

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> >.

HOLGUIN, F. Oxidative stress in airway diseases. **Ann Am Thorac Soc**, v. 10 Suppl, p. S150-7, Dec 2013. ISSN 2325-6621. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24313766> >.

HOSOGAI, N. et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 901-11, Apr 2007. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395738> >.

HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; EL NAHAS, M. Obesity and diabetes in the developing world-- a growing challenge. **N Engl J Med**, v. 356, n. 3, p. 213-5, Jan 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17229948> >.

IBGE. **Estudo Nacional da Despesa Familiar (Endef) 1974-1975**.

_____. **Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE 2010.

IKEUCHI, H. et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 4, p. 1037-46, Apr 2005. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15818686> >.

JAMES, P. T. et al. The worldwide obesity epidemic. **Obes Res**, v. 9 Suppl 4, p. 228S-233S, Nov 2001. ISSN 1071-7323. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707546> >.

JONES, R. L.; NZEKWU, M. M. The effects of body mass index on lung volumes. **Chest**, v. 130, n. 3, p. 827-33, Sep 2006. ISSN 0012-3692. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963682> >.

KAKIMOTO, P. A.; KOWALTOWSKI, A. J. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. **Redox Biol**, v. 8, p. 216-25, Aug 2016. ISSN 2213-2317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26826574> >.

KAVAZIS, A. N. et al. Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 6, p. 842-50, Mar 2009. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185055> >.

KOENIG, S. M. Pulmonary complications of obesity. **Am J Med Sci**, v. 321, n. 4, p. 249-79, Apr 2001. ISSN 0002-9629. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11307867> >.

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> >.

LANZETTI, M. et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 375-81, Apr 2008. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18281194> >.

LEE, H. S.; KIM, C. K. Effect of recombinant IL-10 on cultured fetal rat alveolar type II cells exposed to 65%-hyperoxia. **Respir Res**, v. 12, p. 68, May 2011. ISSN 1465-993X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609457> >.

LIONETTI, V.; RECCHIA, F. A.; RANIERI, V. M. Overview of ventilator-induced lung injury mechanisms. **Curr Opin Crit Care**, v. 11, n. 1, p. 82-6, Feb 2005. ISSN 1070-5295. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659950> >.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem Biol Interact**, v. 224, p. 164-75, Dec 2014. ISSN 1872-7786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452175> >.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 4, p. 469-86, Dec 2003. ISSN 0001-3765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14605681> >.

MARÍN-CORRAL, J. et al. Redox balance and cellular inflammation in the diaphragm, limb muscles, and lungs of mechanically ventilated rats. **Anesthesiology**, v. 112, n. 2, p. 384-94, Feb 2010. ISSN 1528-1175. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068457> >.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, v. 47, n. 3, p. 469-74, Sep 1974. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4215654> >.

MARTIN, A. A. Why can't we control our food intake? The downside of dietary variety on learned satiety responses. **Physiol Behav**, v. 162, p. 120-9, Aug 2016. ISSN 1873-507X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27074352> >.

MARTINS, M. A. et al. High fat diets modulate nitric oxide biosynthesis and antioxidant defence in red blood cells from C57BL/6 mice. **Arch Biochem Biophys**, v. 499, n. 1-2, p. 56-61, Jul 2010. ISSN 1096-0384. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20450877> >.

- 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> >.
- MCNELIS, J. C.; OLEFSKY, J. M. Macrophages, immunity, and metabolic disease. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 36-48, Jul 2014. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035952> >.
- MONTES, V. N. et al. Anti-HMGB1 antibody reduces weight gain in mice fed a high-fat diet. **Nutr Diabetes**, v. 5, p. e161, Jun 2015. ISSN 2044-4052. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26075638> >.
- 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> >.
- 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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22804763> >.
- NASCIMENTO, F. A. et al. Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil). **Exp Toxicol Pathol**, v. 62, n. 1, p. 17-25, Jan 2010. ISSN 1618-1433. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19186042> >.
- NAVRATILOVA, Z. Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 150, n. 2, p. 191-204, Nov 2006. ISSN 1213-8118. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426779> >.
- NG, S. F. et al. Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 963-6, Oct 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962845> >.
- OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 9, p. E396-406, Sep 2013. ISSN 1930-739X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23696431> >.
- OLIVEROS, H.; VILLAMOR, E. Obesity and mortality in critically ill adults: a systematic review and meta-analysis. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 3, p. 515-21, Mar 2008. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18239602> >.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252989> >.

PARAMESWARAN, K.; TODD, D. C.; SOTH, M. Altered respiratory physiology in obesity. **Can Respir J**, v. 13, n. 4, p. 203-10, 2006 May-Jun 2006. ISSN 1198-2241. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16779465> >.

PENA, K. B. et al. The administration of a high refined carbohydrate diet promoted an increase in pulmonary inflammation and oxidative stress in mice exposed to cigarette smoke. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 11, p. 3207-3217, 2016. ISSN 1178-2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28008246> >.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **Int J Biomed Sci**, v. 4, n. 2, p. 89-96, Jun 2008. ISSN 1550-9702. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675073> >.

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> >.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 357-63, 1994. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015470> >.

RICCI, M. F. et al. **Nitroergic Myenteric Neurons are Spared in Experimental Chagasic Megacolon**: Journal of Neuroinfectious Diseases. 7: 1-8 p. 2016.

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> >.

ROSANNA, D. P.; SALVATORE, C. Reactive oxygen species, inflammation, and lung diseases. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 26, p. 3889-900, 2012. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632750> >.

RUTZ, S.; EIDENSCHENK, C.; OUYANG, W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. **Immunol Rev**, v. 252, n. 1, p. 116-32, Mar 2013. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23405899> >.

SANTOS, C. C. et al. Bench-to-bedside review: Bio-trauma and modulation of the innate immune response. **Crit Care**, v. 9, n. 3, p. 280-6, Jun 2005. ISSN 1466-609X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987418> >.

SEBASTIAN, J. C. Respiratory physiology and pulmonary complications in obesity. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 27, n. 2, p. 157-61, Apr 2013. ISSN 1878-1594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23731878> >.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169-80, May 2007. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498510> >.

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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17095405> >.

SIRJANI, M. et al. The effects of high fat, low carbohydrate and low fat, high carbohydrate diets on tumor necrosis factor superfamily proteins and proinflammatory cytokines in C57BL/6 mice. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 13, n. 4, p. 247-55, Aug 2014. ISSN 1735-1502. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24659160> >.

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

SOARES, N. P. et al. The Effects of the Combination of a Refined Carbohydrate Diet and Exposure to Hyperoxia in Mice. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1014928, 2016. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28018521> >.

SONNENBERG, G. F. et al. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. **J Exp Med**, v. 207, n. 6, p. 1293-305, Jun 2010. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498020> >.

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> >.

TASHIRO, H. et al. Saturated Fatty Acid Increases Lung Macrophages and Augments House Dust Mite-Induced Airway Inflammation in Mice Fed with High-Fat Diet. **Inflammation**, v. 40, n. 3, p. 1072-1086, Jun 2017. ISSN 1573-2576. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28365872> >.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 10, p. 772-83, Oct 2006. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998510> >.

VAN DER HEIJDEN, R. A. et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. **Aging (Albany NY)**, v. 7, n. 4, p. 256-68, Apr 2015. ISSN 1945-4589. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979814> >.

VUKOVIĆ, R. et al. Impact of ovariectomy, high fat diet, and lifestyle modifications on oxidative/antioxidative status in the rat liver. **Croat Med J**, v. 55, n. 3, p. 218-27, Jun 2014. ISSN 1332-8166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24891280> >.

WAKI, H.; TONTONOZ, P. Endocrine functions of adipose tissue. **Annu Rev Pathol**, v. 2, p. 31-56, 2007. ISSN 1553-4006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039092> >.

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, Mar 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26955891> >.

WANG, C. Y.; LIAO, J. K. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. **Methods Mol Biol**, v. 821, p. 421-33, 2012. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22125082> >.

WANG, T. et al. Endothelial cell signaling and ventilator-induced lung injury: molecular mechanisms, genomic analyses, and therapeutic targets. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 312, n. 4, p. L452-L476, Apr 2017. ISSN 1522-1504. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27979857> >.

WHO. **Obesity: Preventing and managing the global epidemic – Report of a WHO consultation on obesity** Geneva 1998.

_____. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 894, p. i-xii, 1-253, 2000. ISSN 0512-3054. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234459> >.

_____. Obesity and overweight. 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> >.

WINZELL, M. S.; AHRÉN, B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 3, p. S215-9, Dec 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561913> >.

WOODS, S. J. et al. Kinetic profiling of in vivo lung cellular inflammatory responses to mechanical ventilation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 308, n. 9, p. L912-21, May 2015. ISSN 1522-1504. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25770178> >.

WU, J. Y. et al. Protective effect of interleukin-10 and recombinant human keratinocyte growth factor-2 on ventilation-induced lung injury in rats. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 4, p. 15642-51, Dec 2015. ISSN 1676-5680. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26634532> >.

WU, Z. et al. Interleukin 22 attenuated angiotensin II induced acute lung injury through inhibiting the apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 2210, May 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28526849> >.

YILDIZ, C. et al. Mechanical ventilation induces neutrophil extracellular trap formation. **Anesthesiology**, v. 122, n. 4, p. 864-75, Apr 2015. ISSN 1528-1175. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25665049> >.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236> >.

10. ANEXO

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



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

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

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2015/41, intitulado **“Estudo dos efeitos da dieta hiperlipídica no processo inflamatório pulmonar e sistêmico de camundongos C57BL/6 submetidos à ventilação mecânica”**, que tem como responsável o/a Prof(a). Dr(a). Frank Silva Bezerra, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados			
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo
Camundongo C57BL/6	40	03 MESES	MACHO

Restrição de dieta: () sim (X) não

Especificar:

Este Certificado expira em: **01/01/2021**.

Ouro Preto, 16 de novembro de 2015.

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