

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

**FERNANDO FONSECA DOS REIS**

**EFEITO PROTETOR DA DEXAMETASONA NA LESÃO PULMONAR INDUZIDA  
PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA EM RATOS WISTAR**

**JUIZ DE FORA  
2015**

**FERNANDO FONSECA DOS REIS**

**EFEITO PROTETOR DA DEXAMETASONA NA LESÃO PULMONAR INDUZIDA  
PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA EM RATOS WISTAR.**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde; Universidade Federal de Juiz de Fora - Programa de Pós-Graduação em Saúde; área de concentração em Saúde Brasileira.

Orientador: Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro

Coorientador: Prof. Dr. Maycon de Moura Reboredo

**JUIZ DE FORA**

**2015**

**FERNANDO FONSECA DOS REIS**

**EFEITO PROTETOR DA DEXAMETASONA NA LESÃO PULMONAR INDUZIDA  
PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA EM RATOS WISTAR.**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde; Universidade Federal de Juiz de Fora - Programa de Pós-Graduação em Saúde; área de concentração em Saúde Brasileira.

Aprovado em: 04 de Agosto de 2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Abrahão Elias Hallack Neto  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Julio Cesar Moraes Lovisi  
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro pela oportunidade do trabalho em conjunto, convivência e ajuda na elaboração, execução e apresentação desta dissertação. Ao meu coorientador Prof. Dr. Maycon de Moura Reboredo pela ajuda e ensinamentos imprescindíveis nesta caminhada. À Prof.<sup>a</sup> Dra. Leda Marília Fonseca Lucinda pelo imenso apoio na realização de todas as etapas do experimento. Ao Prof. Dr. Júlio César Abreu de Oliveira por fazer da Pneumologia do HU/UFJF um centro de excelência. A todos os amigos do Núcleo de Pesquisa em Pneumologia, em especial Aydra, Lídia, Aparecida e Manfrinni, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho. Aos professores e funcionários do Centro de Biologia da Reprodução pela dedicação e zelo na condução dos trabalhos experimentais. Agradeço também aos meus colegas preceptores da residência de clínica médica da Universidade Federal de Viçosa que não mediram esforços ao assumirem minhas tarefas quando não pude estar presente. Agradeço a minha esposa Cristiane por compreender a importância deste projeto, aos meus pais, irmãos e afilhada Luiza pelo amor incondicional. A Deus por sempre tornar sereno meus caminhos. Enfim agradeço a todos que, sabendo das minhas limitações, não mediram esforços para que este sonho se realizar-se.

## RESUMO

**Introdução:** A lesão pulmonar induzida pela ventilação (VILI) é caracterizada por uma resposta inflamatória secundária ao stress/strain não fisiológicos impostos aos pulmões durante a ventilação mecânica. Apesar do conhecimento de que após a retirada do estímulo lesivo, os pulmões tendem a se recuperar, os efeitos de medicações anti-inflamatórias nesta recuperação ainda são incertos. **Objetivo:**

Avaliar o efeito da dexametasona nas trocas gasosas, edema, inflamação e histologia pulmonar em diferentes momentos após indução da VILI, em ratos Wistar.

**Métodos:** Os animais foram inicialmente alocados em dois grupos conforme recebessem dexametasona (grupo dexametasona – GD, n=26) ou salina (grupo controle – GC, n=31) intraperitoneal (i.p.). Após 30 minutos, os animais foram ventilados durante 1 hora, para indução da VILI, com os seguintes parâmetros: volume corrente ( $V_T$ ) de 35 ml/Kg, pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 0 cmH<sub>2</sub>O, frequência respiratória (FR) de 18 /min e fração inspirada de oxigênio ( $F_{I}O_2$ ) de 100%. Em seguida os grupos GD e GC foram alocados para serem eutanasiados em diferentes momentos: 0h, 4h, 24h e 168h após a ventilação lesiva. Antes da eutanásia, eles foram anestesiados e ventilados por 10 minutos ( $V_T$  de 6 ml/kg, FR de 80 /min, PEEP de 2 cmH<sub>2</sub>O,  $F_{I}O_2$  de 100%), para estabilização e coleta da gasometria. Após a eutanásia, foram analisados o edema pulmonar, a citologia do lavado broncoalveolar (LBA) e a histologia pulmonar. Um grupo sham (GS, n=6), foi ventilado por 10 minutos com os mesmos parâmetros e analisado para comparação com os grupos GD e GC. **Resultados:** VILI foi observada no GC, o qual apresentou um maior escore de lesão pulmonar aguda comparada com GS em 0h, 4h e 24h ( $p < 0,05$ ). A dexametasona reduziu a injúria pulmonar, e o escore no GD

não foi significativamente diferente do GS, e foi menor que no GC 4h e 24h ( $p < 0,05$ ). A contagem de neutrófilos no LBA aumentou tanto no GC quanto no GD, atingindo pico 4h após VM ( $p < 0,05$ ). No entanto, a contagem de neutrófilos atingiu menores níveis no GD comparado com GC em 4h e 24h ( $p < 0,05$ ). A dexametasona também atenuou o prejuízo na oxigenação que foi observado no GC imediatamente após a VM lesiva. **Conclusões:** Neste modelo experimental, a dexametasona reduziu a inflamação e a lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica com alto  $V_T$ , resultando em melhor oxigenação após a VILI. Estes resultados reforçam a importância do biotrauma na patogênese da VILI, e a necessidade do estudo de terapias anti-inflamatórias para prevenção e tratamento dessa condição.

Palavras-chave: Lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica. Dexametasona. Síndrome do desconforto respiratório agudo.

## ABSTRACT

**Introduction:** Ventilator induced lung injury (VILI) is characterized by inflammatory response to a non-physiological stress/strain imposed to the lungs, during mechanical ventilation (MV). Although it is known that, after the removal of the harmful stimulus, the lungs tend to recover, the effects of anti-inflammatory drugs on this recovery is still uncertain. **Objectives:** To evaluate the effects of dexamethasone on arterial blood gases, edema, inflammation, and lung histology at different times after VILI induction in Wistar rats. **Methods:** The animals were initially allocated into two groups according to the intraperitoneal administration of dexamethasone (dexamethasone group – DG, n=26), or saline (control group – CG, n=31). After 30 minutes, VILI was induced by one hour of MV with the following settings: tidal volume ( $V_T$ ) of 35 ml/Kg, respiratory rate (RR) of 18 /min, positive end-expiratory pressure (PEEP) of 0 cmH<sub>2</sub>O, and fraction of inspired oxygen ( $F_{I}O_2$ ) of 100%. Then, the animals in the DG and the CG groups were allocated to be submitted to euthanasia at different times: 0, 4, 24 and 168 hours, after the injurious MV. Before euthanasia, they were anesthetized and ventilated for 10 minutes ( $V_T$  of 6 ml/kg, RR of 80 /min, PEEP of 2 cmH<sub>2</sub>O,  $F_{I}O_2$  of 100%) for stabilization, and arterial blood gases analysis. After euthanasia, lung edema, total and differential cell count in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and lung histology were analyzed. A sham group (SG, n=6) was ventilated for 10 minutes with the same settings, and analyzed for comparisons with the CG and DG groups. **Results:** VILI was observed in the CG, which presented a higher acute lung injury score compared to the SG, at 0h, 4h and 24h ( $p < 0.05$ ). The dexamethasone decreased the lung injury, and the score in the DG was not significantly different from the SG, and was lower than the CG 4h and 24h ( $p < 0.05$ ). BAL neutrophil counts increased both in the CG and in the DG, peaking at 4h after

MV ( $p < 0.05$ ). However, the neutrophil counts reached lower levels in DG, compared to CG at 4h and 24h ( $p < 0.05$ ). Dexamethasone also improved the oxygenation impairment that was seen in the CG immediately after the injurious MV.

**Conclusions:** In this experimental model, dexamethasone decreased the inflammation and the lung injury induced by mechanical ventilation with high  $V_T$ . These findings highlight the importance of the biotrauma in the VILI pathogenesis, and the necessity of carrying out researches on anti-inflammatory therapies to prevent and treat this condition.

Keywords: Ventilator induced lung injury. Dexamethasone. Acute respiratory distress syndrome.



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AP-1	Proteína ativadora 1
ATF-2	Fator 2 ativador da transcrição
DMOS	Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas
Egr-1	Resposta de crescimento precoce 1
Elk-1	Proteína 1 ETS- <i>like</i>
ERK	Kinase regulada por sinal extracelular
F <sub>I</sub> O <sub>2</sub>	Fração inspirada de oxigênio
FR	Frequência respiratória
GC	Grupo controle
GD	Grupo dexametasona
GS	Grupo sham
HCO <sub>3</sub>	Bicarbonato
I:E	Relação inspiração e expiração
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
i.p.	Intraperitoneal
JNK	Kinase c-Jun N-terminal
LBA	Lavado broncoalveolar
LPA	Lesão pulmonar aguda
MAPK	Proteína kinase ativada por mitógeno
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófagos 2
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear kappa beta
PaCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial
PaO <sub>2</sub>	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	Relação entre a pressão parcial de oxigênio no sangue arterial e a fração inspirada de oxigênio
PEEP	Pressão positiva ao final da expiração
pH	pH arterial
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SF 0,9%	Solução fisiológica a 0,9%

TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VALI	Lesão pulmonar associada à ventilação
VILI	Lesão pulmonar induzida pela ventilação
VM	Ventilação mecânica
V <sub>T</sub>	Volume corrente
W/D	Relação peso úmido/peso seco

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
2.1	DEFINIÇÃO DE LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA.....	14
2.2	FISIOPATOLOGIA.....	15
2.3	BIOTRAUMA.....	19
2.4	CORTICÓIDE E VILI.....	23
2.5	MODELO DE LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA EM RATOS.....	25
3	<b>HIPÓTESES</b> .....	29
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
4.1	OBJETIVO GERAL.....	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
5.1	ANIMAIS.....	31
5.2	CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO.....	31
5.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	32
5.3.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	32
5.3.2	PROTOCOLO DE VILI.....	33
5.3.3	EUTANÁSIA E REMOÇÃO DE ÓRGÃOS.....	34
6	<b>VARIÁVEIS ANALISADAS</b> .....	37
6.1	TROCAS GASOSAS.....	37
6.2	RELAÇÃO PESO ÚMIDO/PESO SECO (W/D).....	38

6.3	LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	38
6.4	HISTOPATOLOGIA DE DANO TECIDUAL PULMONAR.....	39
6.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
7	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	42
7.1	RESUMO DO ARTIGO.....	43
8	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	46
9	<b>CONCLUSÃO.....</b>	47
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	48
	<b>APÊNDICES.....</b>	55
	<b>ANEXOS.....</b>	79

## 1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 50, a ventilação mecânica (VM) com pressão positiva passou a ser uma ferramenta amplamente utilizada em todo o mundo no manejo do paciente com insuficiência respiratória aguda ou crônica agudizada. No entanto, com o passar do tempo, uma grande variedade de complicações foram detectadas, sendo a lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (VILI, do inglês, *ventilator-induced lung injury*) uma das mais complexas e de difícil manuseio (DREYFUSS; SAUMON, 1998; SLUTSKY; RANIERI, 2013).

A VILI é o resultado de uma complexa interação entre várias forças mecânicas atuando nas estruturas pulmonares (PELOSI; ROCCO, 2008). Amplamente reconhecida como um potencial efeito adverso da ventilação mecânica, a VILI é comumente atribuída à utilização de excessivos volumes correntes (volutrauma) e/ou pressões inspiratórias (barotrauma). Tanto o volutrauma quanto o barotrauma promovem deformações pulmonares não fisiológicas, denominadas *strain* (que pode ser considerado como a razão entre volume corrente e capacidade residual funcional), e pressões excessivas sobre os tecidos pulmonares, ou *stress* (que pode ser estimado pela pressão transpulmonar), atuando tanto de forma difusa como local, na interface entre as unidades pulmonares abertas e fechadas (PROTTI et al., 2011). Os principais alvos desta lesão incluem o epitélio alveolar, as células endoteliais, a matriz extracelular e as vias aéreas periféricas (PELOSI; ROCCO, 2008).

Apesar da VILI iniciar-se como um evento mecânico em resposta a níveis não fisiológicos de *stress* e *strain*, ela é amplificada a partir da deflagração de uma resposta inflamatória exagerada, denominada biotrauma (TREMBLAY; SLUTSKY, 1998). Esta resposta inicia-se com a mecanotransdução, que é a conversão do

estímulo mecânico em resposta bioquímica e biomolecular (ROCCO; DOS SANTOS; PELOSI, 2012), seguida da ativação de fatores de transcrição, que, ao modularem a resposta gênica, levam a produção local e sistêmica de vários mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-8 (IL-8) (GATTINONI et al., 2003). As ações destas citocinas convergem para ativação e recrutamento de neutrófilos para o pulmão, com subsequente produção de proteases e espécies reativas de oxigênio, que têm papel central na injúria pulmonar (KIM, D. H. et al., 2014). O conhecimento cada vez maior da natureza inflamatória da VILI abre perspectivas para o estudo de medicações anti-inflamatórias, tanto como medidas para sua prevenção, quanto para seu tratamento.

Os corticosteroides são hormônios com potente ação anti-inflamatória e imunomoduladora, que agem inibindo diferentes estágios da cascata inflamatória e têm o potencial de suprimir a ativação e o recrutamento de neutrófilos (BARNES, 2006b). Alguns estudos demonstraram que estas medicações são capazes de acelerar a resolução do processo inflamatório, melhorar a oxigenação e reduzir tempo de ventilação mecânica e mortalidade quando utilizadas em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (THOMPSON, 2010), condição esta com alterações fisiopatológicas similares à VILI (NARDELLI et al., 2007).

Na VILI, vários estudos experimentais já demonstraram que, quando utilizados profilaticamente, os corticoides são capazes de reduzir a resposta inflamatória e melhorar desfechos como oxigenação, edema pulmonar e injúria tecidual (HEGEMAN et al., 2011; HELD et al., 2001). Entretanto, nenhum estudo, até o momento, avaliou o potencial dessa medicação em acelerar a recuperação da VILI já instituída, o que motivou a condução do nosso trabalho.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DEFINIÇÃO DE LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA

Desde meados do século passado, com a pandemia de poliomielite, a VM vem sendo largamente utilizada no tratamento de pacientes críticos com insuficiência respiratória. Atualmente ela representa uma das medidas terapêuticas mais comuns nas unidades de terapia intensiva (UTIs), sendo empregada em 33% a 56% dos pacientes (DAMASCENO et al., 2006; ESTEBAN et al., 2000; ESTEBAN et al., 2002; KARASON et al., 2002). Apesar de essencial para o tratamento de determinadas condições de insuficiência respiratória, a VM está associada a importantes complicações, como, por exemplo, pneumonia e disfunção diafragmática, além de outros danos diretos ao sistema respiratório (AMERICAN THORACIC SOCIETY; INFECTIOUS DISEASES SOCIETY, 2005; DIAZ; OSPINATASCON; SALAZAR, 2014; MARINI, 2013; VASSILAKOPOULOS; PETROF, 2004). Por muito tempo considerou-se que a injúria causada diretamente pela ventilação mecânica restringia-se à lesão estrutural pulmonar que leva a fuga de ar do pulmão para a pleura (pneumotórax), mediastino (pneumomediastino) ou peritônio (pneumoperitônio), todas rotuladas com o termo barotrauma (PINHU et al., 2003). Na década de 1970, entretanto, Webb e Tierney (1974), em um estudo com animais saudáveis, demonstraram que a VM poderia levar a uma lesão pulmonar mais sutil, sem a ocorrência de fuga aérea, porém não menos grave, ao que se denominou VILI (NARDELLI et al., 2007).

A VILI resulta de uma complexa interação entre forças mecânicas que atuam no pulmão durante a VM e depende da natureza, da intensidade e da duração desse

estresse mecânico (TUCCI; BERALDO; COSTA, 2011). Estudos experimentais sugerem que a VILI apresenta características histopatológicas que se assemelham às da SDRA, com infiltrado neutrofílico, edema e hemorragia alveolar, formação de membrana hialina e subsequente colapso alveolar. Poucos estudos avaliaram a evolução da VILI, mas parece que com a persistência do estímulo lesivo, surgem alterações típicas das fases evolutivas da SDRA, como proliferação de fibroblastos e de células epiteliais alveolares tipo II (NARDELLI et al., 2007; TSUNO; PRATO; KOLOBOW, 1990). Ao mesmo tempo, com a supressão do estímulo lesivo, o quadro evolui para recuperação pulmonar (CURLEY et al., 2011).

Além do potencial de induzir lesão em pulmões previamente saudáveis, a VM pode também agravar ou prejudicar a recuperação de uma injúria já presente, sobretudo na SDRA, sendo então denominada por alguns autores de lesão pulmonar associada à ventilação mecânica (VALI, do inglês, *ventilator-associated lung injury*) (HASHEMIAN; MOHAJERANI; JAMAATI, 2014; PINHU et al., 2003).

## 2.2 FISIOPATOLOGIA

Diferentes fatores têm sido implicados na gênese da VILI. Os primeiros estudos experimentais demonstraram que a VM com níveis elevados de pressões inspiratórias foi capaz de gerar uma lesão inflamatória de características semelhantes às da SDRA, ao que se denominou barotrauma (WEBB; TIERNEY, 1974). No entanto, Dreyfuss et al. (1988), em estudo com ratos saudáveis, aventaram a hipótese de que altos volumes correntes e não altas pressões associavam-se à VILI. Eles ventilaram animais com pressões elevadas (45 cmH<sub>2</sub>O), mas com volumes



correntes ( $V_T$ ) altos (40 ml/kg) ou baixos (19 ml/kg), utilizando para isso faixas toracoabdominais que restringiam a expansão pulmonar e assim reduziam o  $V_T$ . Utilizaram também animais nos quais  $V_T$  elevados (44 ml/kg) eram gerados por pressão inspiratória negativa. Neste estudo, apenas os ratos ventilados com alto  $V_T$ , independente se com pressão positiva ou negativa, apresentaram lesão pulmonar, sugerindo que o volume seria mais importante na indução da VILI do que a pressão em si, surgindo a definição do termo volutrauma. Porém, na verdade, existe uma correlação entre o  $V_T$  e a pressão obtida, sobretudo quando consideramos a pressão transpulmonar, que é a diferença entre a pressão alveolar (estimada na beira do leito pela pressão de platô) e a pressão pleural (estimada pela pressão esofágica). Assim, voltando ao experimento de Dreyfuss et al., nos animais com o tórax enfaixado e que não apresentaram VILI, a pressão transpulmonar era baixa, enquanto naqueles ventilados sem a faixa ou com pressão negativa, conseqüentemente com elevados  $V_T$  e VILI, a pressão transpulmonar era alta. Neste sentido, ambos os termos, volutrauma e barotrauma, estão corretos (GATTINONI et al., 2010; SLUTSKY; RANIERI, 2013).

Além dos estudos experimentais que já demonstraram de forma inequívoca a importância de elevadas pressões alveolares e altos  $V_T$  na gênese da VILI, os resultados de alguns ensaios clínicos confirmaram a relevância destes parâmetros, pelo menos na condução de pacientes com SDRA. Amato et al. (1998) evidenciaram que, em pacientes com SDRA, o uso de uma estratégia ventilatória protetora baseada em baixos  $V_T$  (6 ml/kg) e baixas pressões inspiratórias (<30 cmH<sub>2</sub>O), comparada a uma estratégia convencional ( $V_T$  12 ml/kg e pressão platô <50 cmH<sub>2</sub>O), reduziu o tempo de ventilação mecânica, a incidência de barotrauma e a mortalidade. Achados semelhantes foram encontrados pelo grupo ARDSNET, em

estudo multicêntrico (dez UTIs norte-americanas) e com um grande número de pacientes, confirmando o papel protetor dessa estratégia na redução da mortalidade na SDRA (THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME NETWORK, 2000).

Outro componente importante na VILI é o atelectrauma, nome dado à lesão decorrente da tensão excessiva aplicada durante a abertura e fechamento cíclicos de vias aéreas distais, sacos alveolares e alvéolos, sobretudo nas regiões próximas às áreas não aeradas (DOS SANTOS; SLUTSKY, 2006). Além do estresse de cisalhamento local, este fenômeno pode ainda inativar o surfactante, aumentando a tensão superficial e a tendência ao colapso dessas áreas, criando um círculo vicioso que potencializa a VILI (ITO et al., 1997; MEAD; TAKISHIMA; LEITH, 1970). Entre as estratégias clínicas que têm sido defendidas para minimizar o atelectrauma está o emprego de pressão positiva ao final da expiração (PEEP) mais elevada, que pode ainda ser precedida de uma manobra de recrutamento alveolar (DE PROST; DREYFUSS, 2012). Apesar dos estudos clínicos que avaliaram o impacto da aplicação de PEEPs mais elevadas na SDRA não terem mostrado impacto na mortalidade (BROWER et al., 2004; MEADE et al., 2008; MERCAT et al., 2008), uma metanálise dos mesmos identificou este benefício entre os pacientes com doença mais grave (BRIEL et al., 2010). Outra estratégia que também pode reduzir o atelectrauma é a ventilação em posição prona. Na ventilação mecânica em posição supina, os alvéolos das regiões dorsais, que já apresentam menor volume em função de sua posição dentro do tórax, têm seus volumes ainda mais reduzidos em função de forças gravitacionais, gerando atelectasias por compressão, fenômeno agravado na SDRA. O peso do coração e a pressão abdominal deslocando o diafragma no sentido cefálico intensificam essa compressão nas bases pulmonares

(PELOSI et al., 1994). Quando o indivíduo é ventilado em posição prona, as forças gravitacionais atuarão sobre as regiões ventrais, que compreendem menor massa alveolar (GATTINONI et al., 1991). Além disso, nesta posição não há compressão de alvéolos pelo peso do coração, nem pela pressão abdominal (ALBERT; HUBMAYR, 2000). Assim, a posição prona reduz as atelectasias de compressão, ou seja, recruta áreas para a ventilação, com potencial de reduzir o atelectrauma (BIANCHI, 2015).

Dois conceitos mais recentes que ajudam a compreender a VILI são os de *stress* e *strain*. O *stress* pode ser entendido como a força gerada em uma determinada área em reação à força externa a ela aplicada e de igual magnitude. Em ventilação mecânica, o *stress* é a força desenvolvida na estrutura pulmonar em reação à pressão transpulmonar; como são da mesma magnitude, a pressão transpulmonar pode ser considerada como medida do *stress* (CHIUMELLO et al., 2008). Já o *strain* é a deformação de uma estrutura em relação ao seu estado de relaxamento, o que no pulmão corresponde à alteração do volume alveolar, a partir de seu estado na capacidade residual funcional (final da expiração) até a capacidade pulmonar total (final da inspiração). Em ventilação mecânica, o *strain* pode ser representado pela relação entre o volume corrente e a capacidade residual funcional (PLATAKI; HUBMAYR, 2010). A exposição a níveis elevados de *stress* e *strain*, mesmo que insuficientes para ruptura de estruturas pulmonares, pode promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias e o acúmulo de leucócitos, que serão responsáveis pela VILI. Esta resposta inflamatória em reação a forças mecânicas é denominada biotrauma (SLUTSKY, 1999; TREMBLAY; SLUTSKY, 1998).

### 2.3 BIOTRAUMA

O conceito de biotrauma, introduzido em 1998 por Slutsky e Tremblay, refere-se ao processo pelo qual, mesmo sem lesão direta, o *stress* e o *strain* não fisiológicos são capazes de alterar a fisiologia normal das células pulmonares, promovendo a liberação de citocinas e recrutamento de neutrófilos, com subsequente inflamação e lesão pulmonar. Especula-se ainda que esta inflamação pode não se restringir aos pulmões e ser capaz de desencadear a disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS) (SLUTSKY; TREMBLAY, 1998; TREMBLAY; SLUTSKY, 1998). A cascata inflamatória no biotrauma passa por quatro fases principais: a mecanotransdução, a ativação de fatores de transcrição, a produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas, e por fim o recrutamento e a ativação de neutrófilos.

O pulmão é sustentado por tecido conjuntivo constituído por três diferentes sistemas de fibras conectadas entre si: uma rede periférica que se estende da pleura visceral ao hilo, uma rede axial que vai do centro das vias aéreas aos ductos alveolares e o parênquima intersticial ancorado entre as duas primeiras. Essas redes são constituídas de colágeno, fibras elásticas e a matriz na qual estão envolvidas (SUKI et al., 2005). Distorções do tecido conjuntivo geradas pela ventilação mecânica são percebidas pelas células pulmonares através de receptores e complexos de adesão que conectam o citoesqueleto à matriz extracelular (INGBER, 1991). Estas células, notadamente as que revestem as vias aéreas, alvéolos e capilares, transformam um estímulo mecânico excessivo gerado pela VM em vias de sinalização bioquímica, ao que chamamos mecanotransdução. Os mecanossensores incluem canais iônicos ativados pelo estiramento, receptores de

integrinas, complexos de adesão focal e receptores de fatores de crescimento (UHLIG; UHLIG, 2004). Portanto, as forças que atuam no pulmão durante a VM podem lesá-lo diretamente pela distorção de suas estruturas, mas também influenciando a mecanotransdução. A magnitude desta lesão depende diretamente dos parâmetros ventilatórios utilizados (PLATAKI; HUBMAYR, 2010).

Em seguida, são ativados fatores de sinalização, como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e a quinase c-Jun N-terminal (JNK), que por sua vez ativam fatores de transcrição como a proteína ativadora 1 (AP-1), o fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ ), o fator 2 ativador da transcrição (ATF-2), a proteína 1 ETS-like (Elk-1) e a resposta de crescimento precoce 1 (Egr-1). Estes fatores ativam a transcrição gênica, com a subsequente produção de citocinas (UHLIG; UHLIG, 2004).

As citocinas, responsáveis pela sinalização entre as células envolvidas na resposta inflamatória, vêm sendo amplamente estudadas em modelos experimentais de lesão pulmonar aguda (LPA). Elas são proteínas solúveis de baixo peso molecular, produzidas pelas células epiteliais dos brônquios, bronquíolos, alvéolos e também pelos neutrófilos e macrófagos alveolares (HALBERTSMA et al., 2005). Na VILI, várias são as citocinas envolvidas, algumas pró-inflamatórias e outras anti-inflamatórias, e é justamente o balanço entre elas que irá definir a direção da resposta imune (PARK et al., 2001). As citocinas mais frequentemente envolvidas na VILI em estudos experimentais com o uso de volumes correntes e/ou pressões inspiratórias elevadas são: interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8 ou seu equivalente em roedores, a proteína inflamatória de macrófago 2 – MIP-2), sendo este o mais potente quimiotático para leucócitos (GATTINONI et al., 2003; IWASHITA et al., 2014; KIM, S. H. et al., 2015; LAI;

WANG; CAI, 2015; TREMBLAY; SLUTSKY, 1998). Outra citocina importante é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), com vários estudos evidenciando a participação deste mediador na VILI, bem como redução da resposta inflamatória quando medicações com potencial de inibi-lo foram utilizadas (IMAI et al., 1999; TREMBLAY et al., 2002; WILSON; CHOUDHURY; TAKATA, 2005). Em estudos clínicos longitudinais, os níveis elevados de citocinas estiveram associados a uma lesão pulmonar mais grave e pior desfecho, fortalecendo o conceito de que a lesão pulmonar é, pelo menos em parte, resultado de uma resposta inflamatória massiva (MEDURI et al., 1995; SLUTSKY; TREMBLAY, 1998).

Apesar de diferentes mediadores serem produzidos na cascata inflamatória do biotrauma, a maioria deles converge para a ativação e atração de neutrófilos para o pulmão, principalmente a IL-8, a IL-1 e o TNF- $\alpha$  (PUNEET; MOOCHHALA; BHATIA, 2005; UHLIG; UHLIG, 2004). Os neutrófilos ativados desencadeiam estresse oxidativo, com ação de enzimas proteolíticas nos alvéolos, que amplificam a inflamação e a lesão local, levando, entre outras alterações, a edema pulmonar e, conseqüentemente, a distúrbios nas trocas gasosas (ABRAHAM, 2003). Estudos experimentais com animais depletados de neutrófilos ou que testaram medicações com potencial de reduzir a atividade destes demonstraram melhora significativa dos marcadores de lesão pulmonar, como edema, troca gasosa, citocinas no lavado broncoalveolar (LBA) e alterações histológicas (KAWANO et al., 1987; KIM, D. H. et al., 2014; LAI et al., 2015).

Esta resposta inflamatória encontrada na VILI culminará em alterações histopatológicas, tais como edema alveolar e intersticial, lesões endoteliais com hemorragia alveolar, formações de gaps inter/intracelular, desnudamento com rompimento da membrana basal, além do infiltrado neutrofílico, que são semelhantes

às descritas na SDRA (PLATAKI; HUBMAYR, 2010; WEBB; TIERNEY, 1974). Gajic et al. (2003), através de microscopia confocal em estudo *ex-vivo* com pulmões de ratos, demonstraram que, com a cessação do estresse mecânico imposto pela VM, há uma reversão quase que imediata das alterações celulares decorrentes do mesmo. Entretanto, as alterações histológicas evidenciadas à microscopia óptica e descritas acima, se mantiveram, reforçando a ideia de que vias diferentes de lesão pulmonar coexistem e que, após deflagrada a resposta inflamatória, mesmo que o estímulo lesivo seja retirado, as alterações histológicas surgirão, podendo culminar em disfunção do órgão.

Além dos estudos experimentais, alguns ensaios clínicos também suportam a teoria do biotrauma na gênese da VILI. Ranieri et al., em 1999, encontraram níveis significativamente mais elevados de citocinas inflamatórias em pacientes ventilados com altos  $V_T$  quando comparado com  $V_T$  baixo (RANIERI et al., 1999). No ano seguinte, o grupo ARDSNet demonstrou que uma estratégia ventilatória protetora esteve associada à redução dos níveis séricos de IL-6 e também da mortalidade de pacientes com SDRA (THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME NETWORK, 2000). Nesta mesma linha, o trabalho de Stüber et al. (2002) sugeriu haver relação causal entre  $V_T$  elevado e liberação de citocinas, pois além da elevação sérica desses mediadores após alteração dos parâmetros ventilatórios com aumento do  $V_T$ , houve também retorno aos níveis basais após seis horas de restituição da estratégia ventilatória protetora.

Acredita-se que a reação inflamatória decorrente da VILI possa alcançar também a circulação sistêmica e órgãos à distância, justificando, talvez, o achado de que a maioria dos pacientes com SDRA vão a óbito por disfunção de múltiplos órgãos e sistemas e não por hipoxemia, como era de se esperar (AMATO et al.,

1998; MACCALLUM; EVANS, 2005; MONTGOMERY et al., 1985). Neste cenário, frequentemente nos deparamos com o dilema de situações em que a VM é um suporte de vida indispensável, porém não isento de complicações. Portanto, estratégias farmacológicas que busquem minimizar o biotrauma parecem bastante interessantes.

## 2.4 CORTICOIDE E VILI

O conhecimento crescente da importância de mediadores inflamatórios e de neutrófilos na patogênese da VILI tem alavancado a pesquisa de intervenções farmacológicas na prevenção e/ou tratamento dessa desordem (DE PROST; DREYFUSS, 2012; UHLIG; UHLIG, 2004). Alguns autores, por exemplo, estudaram os efeitos de estatinas e inibidores do sistema renina-angiotensina na redução da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar (MULLER et al., 2010; JIANG et al., 2007); outros avaliaram a capacidade dos bloqueadores de canais catiônicos (PARKER; IVEY; TUCKER, 1998) e dos agonistas beta-adrenérgicos (DE PROST et al., 2008) de acelerar a reabsorção do edema, mas ainda sem resultados definitivos. Em função dos conhecimentos acerca da fisiopatologia da SDRA e da VILI, existe um aumento crescente na pesquisa de terapias que buscam reduzir a infiltração neutrofílica no pulmão, seja com o uso de anticorpos anti-TNF $\alpha$  (WILSON et al., 2005), de inibidores da MIP-2 (QUINN et al., 2002) ou de glicocorticoides (HEGEMAN et al., 2013; OHTA et al., 2001).

Os glicocorticoides são hormônios esteroides com potente ação anti-inflamatória e imunomoduladora, que atuam em diferentes estágios da cascata



inflamatória. Após se ligarem aos seus receptores citoplasmáticos, migram para o núcleo celular e inibem a expressão gênica de fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B e a AP-1 (BARNES, 2006a;2006b; RHEN; CIDLOWSKI, 2005). Além disso, eles podem suprimir a ativação e o recrutamento de neutrófilos, preservando a integridade de células endoteliais e a permeabilidade vascular (THOMPSON, 2003).

Em concordância com estes conhecimentos, vários estudos experimentais avaliaram a ação dos corticoides nesta via inflamatória. O primeiro trabalho com estas características demonstrou que o uso de dexametasona, quando comparado com placebo, foi capaz de inibir a ativação do NF- $\kappa$ B, bem como reduzir os níveis de MIP-2; IL-6 e TNF $\alpha$ , em experimento *ex-vivo* com pulmões de camundongos ventilados com pressão negativa e com  $V_T$  de 32 ml/kg (HELD et al., 2001). No mesmo ano, outro estudo experimental, desta vez com ratos vivos, ventilados com pressão positiva e medicados com metilprednisolona, encontrou redução significativa na contagem de neutrófilos no LBA e melhora da mecânica pulmonar no grupo de animais que recebeu corticoide (OHTA et al., 2001). Apesar de evidenciarem atenuação da resposta inflamatória, estes estudos não avaliaram o benefício desta terapia em relação a desfechos mais importantes, como troca gasosa e edema pulmonar.

Com objetivo de avaliar se a VM com alto  $V_T$  estaria associada a disfunções orgânicas e verificar o potencial benefício do corticoide neste contexto, Nin et al. (2006), ventilaram ratos saudáveis com  $V_T$  de 35 ml/kg e PEEP de 0 cmH<sub>2</sub>O, divididos em dois grupos de acordo com o uso ou não de dexametasona. Desta vez, além da redução de mediadores inflamatórios, eles também encontraram melhora da oxigenação e dos danos histológicos, como congestão capilar, edema intersticial, necrose do epitélio alveolar e formação de membrana hialina. Reforçando estes

achados, mais recentemente foi publicado um novo estudo em que camundongos medicados com diferentes formulações de dexametasona e ventilados com elevado  $V_T$  apresentaram menor expressão de IL-6 e IL-1 $\beta$  e mantiveram preservada a arquitetura pulmonar e a oxigenação, quando comparados com os animais que receberam placebo (HEGEMAN et al., 2011).

Apesar das evidências de que o uso profilático de corticoide é capaz de atenuar a VILI e de estudos em pacientes com SDRA terem demonstrado benefícios dessa medicação em acelerar a resolução do processo inflamatório (MEDURI et al., 2002) e da lesão pulmonar (TANG et al., 2009), conseguindo com isso melhora da oxigenação, redução do tempo de VM e, em alguns casos, da mortalidade, até o momento nenhum trabalho avaliou o potencial dos corticosteroides em acelerar o processo de recuperação da VILI, assim como ocorre na SDRA (SESSLER; GAY, 2010; THOMPSON, 2010).

Pelo exposto, decidimos avaliar, em um modelo experimental com ratos Wistar, o potencial da dexametasona em reduzir a VILI, bem como o de acelerar o processo de recuperação desta lesão.

## 2.5 MODELO DE LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA EM RATOS

As hipóteses clínicas são difíceis de serem testadas em humanos, uma vez que inúmeras variáveis podem estar presentes, além das questões éticas e financeiras envolvidas. Neste sentido, os modelos experimentais são importantes, na medida em que possibilitam testar hipóteses geradas a partir de observações em

humanos, bem como avançar nas pesquisas de resultados encontrados em sistemas *in vitro*. Mesmo que a relevância para humanos de modelos experimentais seja incerta, ainda assim eles são importantes se conseguirem demonstrar, por exemplo, que a inibição de uma via inflamatória específica é capaz de proteger o animal de suas consequências deletérias, sugerindo que esta via é importante em modelos vivos. Idealmente, um modelo animal deve reproduzir os mecanismos e as consequências de uma hipótese testada, incluindo as alterações fisiológicas e patológicas que ocorrem (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008). Assim os estudos com primatas são os mais relevantes, porém os custos elevados e complexidade na organização fazem com que os experimentos com animais menores, como os ratos, por serem mais baratos, relativamente simples e de rápida execução, sejam preferíveis numa fase inicial da pesquisa (MATUTE-BELLO et al., 2011).

Em um modelo experimental de VILI, fatores como o nível da injúria aplicada (avaliado pelos parâmetros ventilatórios utilizados), o tempo de ventilação mecânica e a espécie animal estudada devem ser levados em consideração (DE PROST; SAUMON; DREYFUSS, 2011). Diferenças na estrutura do citoesqueleto pulmonar tornam os animais menores mais susceptíveis à VILI quando comparados com animais de maior porte (MATHIEU-COSTELLO et al., 1995). Por apresentarem um menor volume residual em relação à massa corporal e maior complacência da caixa torácica, para um mesmo *stress* gerado pela VM, as espécies menores são expostas a um maior *strain* e, por consequência, a maior risco de VILI (CAIRONI et al., 2011). Walder et al. (2005) demonstraram que ratos ventilados com pressões expiratórias em torno de 37 cmH<sub>2</sub>O apresentaram, após 3 horas, importante edema pulmonar e elevada mortalidade. Por outro lado, ovelhas ventiladas com pressões inspiratórias

de 58 cmH<sub>2</sub>O por 6 horas desenvolveram apenas discreto edema pulmonar (CARLTON et al., 1990). Além da resposta aos diferentes insultos variar entre as espécies animais estudadas, ela também difere da resposta encontrada em humanos. Estas diferenças podem ocorrer nos receptores que reconhecem os insultos (REHLI, 2002), nos mediadores inflamatórios envolvidos (MATUTE-BELLO et al., 2008), bem como na distribuição tecidual das células inflamatórias (WARNER, 1996). Todas essas particularidades devem ser consideradas na escolha do modelo animal a ser utilizado e na interpretação dos resultados obtidos, os quais não devem ser extrapolados para humanos sem as devidas considerações.

O modelo escolhido para este trabalho foi o da VILI em ratos. A opção pelo rato foi feita pelo fato da VILI já ter sido amplamente estudada nesta espécie, pelo menor custo deste animal em comparação com animais maiores, pela relativa facilidade de manuseio dos mesmos em relação aos procedimentos necessários, pela disponibilidade deste animal em nossa instituição e pela possibilidade de análise dos mediadores inflamatórios potencialmente envolvidos, mesmo que esta não tenha sido inicialmente avaliada neste estudo. Vários trabalhos têm estudado o potencial lesivo da VM em ratos, variando entre eles o  $V_T$ , pressões inspiratórias, o emprego ou não de PEEP e o tempo de ventilação ao qual foram submetidos

Apesar da VILI já ter sido amplamente estudada em modelo experimental com ratos, ao que sabemos, até o momento, apenas dois trabalhos avaliaram seu comportamento ao longo do tempo (CURLEY et al., 2011; NIN et al., 2008). No estudo de Curley et al., os animais foram ventilados com pressão inspiratória de 35 cmH<sub>2</sub>O e PEEP de 0 cmH<sub>2</sub>O por um período que variou entre 95 a 148 minutos (a VM era mantida com estes parâmetros até que a complacência pulmonar caísse mais de 50%). Após este período, os animais eram retirados da VM, recuperados da

anestesia e avaliados nos períodos de tempo pré-determinados (6; 24; 48; 96 horas, 7; 14 dias). Os autores encontraram um pico precoce (6 horas) de neutrófilos no LBA, edema pulmonar e hipoxemia, com gradual recuperação até normalização destes parâmetros em 96 horas. Achado semelhante foi encontrado nas alterações histológicas, porém com pico de lesão e reestabelecimento da arquitetura pulmonar normal um pouco mais tardio (48 horas e 7 dias, respectivamente). O experimento de Nin et al. teve metodologia e resultados bastante semelhantes ao citado, porém neste os animais foram ventilados com  $V_T$  de 35 ml/kg e PEEP de 0 cmH<sub>2</sub>O durante 60 minutos. Os autores evidenciaram pico precoce (após 1 hora de VM) de citocinas no LBA e sangue, como também das alterações histológicas. Assim como no estudo de Curley et al., houve gradual reestabelecimento da arquitetura pulmonar ao longo do tempo, com normalização desta após 72 horas do término da VM. Estes estudos tiveram como motivação a importância do entendimento do processo de recuperação ou progressão VILI, na busca por terapias com potencial de preveni-la e/ou acelerar seu reparo. Por este motivo, optamos por um modelo experimental que permitisse avaliar a VILI ao longo do tempo, bem como o efeito da dexametasona nesta evolução.

### **3 HIPÓTESES**

H0: a dexametasona, em comparação com o placebo, não reduz a VILI e não reduz o tempo para sua recuperação, em modelo experimental com ratos Wistar.

H1: a dexametasona, em comparação com o placebo, reduz a VILI e acelera sua recuperação, em modelo experimental com ratos Wistar.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito protetor da dexametasona sobre a VILI induzida por altos volumes correntes em um modelo experimental com ratos Wistar.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da dexametasona neste modelo sobre:

- Trocas gasosas;
- Edema pulmonar;
- Celularidade no lavado broncoalveolar;
- Histologia pulmonar.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Foram estudados 57 ratos Wistar, com aproximadamente 90 dias de idade, pesando  $286 \pm 15$  g, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR – UFJF, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil).

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora sob o parecer nº 035/2013 (ANEXO A). Os animais receberam cuidados segundo a diretriz do Conselho Nacional de Experimentação Animal (DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS, 2013).

### 5.2 CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

Todos os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, cobertas com camas de maravalha selecionadas (não esterilizada), dotadas de cocho para ração do tipo peletizada e local para mamadeira com água filtrada. Cada gaiola abrigava três animais, que foram mantidos em armários climatizados (Alesco, Brasil) pelo período de uma semana antecedendo o procedimento experimental. Os armários localizavam-se em alojamento com lâmpadas incandescentes, controladas automaticamente para acenderem às 6:00 horas e apagarem às 18:00 horas,



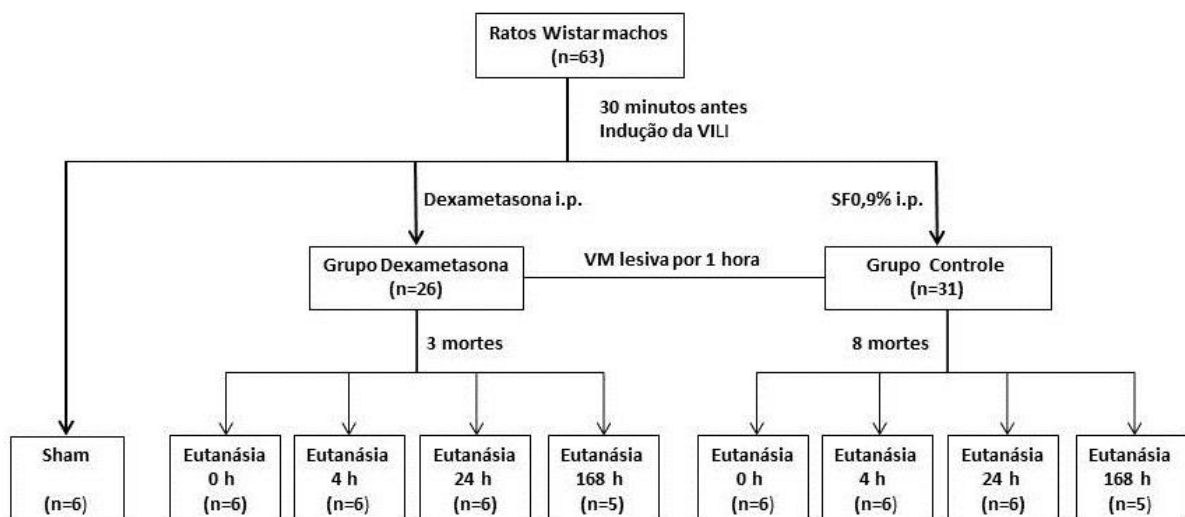
mantendo um fotoperíodo de 12 horas de ambiente claro e 12 horas de ambiente escuro. Os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*.

### 5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

#### 5.3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram inicialmente alocados entre três grupos: dexametasona (GD, n=26), controle (GC, n=31) ou sham (S, n=6). Nos grupos dexametasona e controle, uma segunda alocação foi feita, de acordo com o tempo entre o término da indução de VILI e a eutanásia: imediata (0-h), 4 horas (4-h), 24 horas (24-h) e 168 horas ou 7 dias (168-h). (Figura 1).

Figura 1. Distribuição dos animais nos grupos experimentais.



i.p.: intraperitoneal; VILI: lesão pulmonar induzida pela ventilação; VM: ventilação mecânica.

### 5.3.2 PROTOCOLO DE VILI

Os animais dos grupos dexametasona e controle foram pesados (Balança Filizola MF 4006033, Brasil) e receberam, por via intraperitoneal, dexametasona (6 mg/kg), ou o mesmo volume de soro fisiológico 0,9% (SF 0,9%), respectivamente. Após trinta minutos, eles foram sedados e anestesiados com 80 mg/kg de cloridrato de dexroacetamina (Cristália, Brasil) e 8 mg/kg de xylazina (Ceva, Brasil), ambas administradas por via intraperitoneal. Estas doses foram suficientes para manter o animal em plano anestésico, caracterizado pela supressão do reflexo córneo-palpebral e pela ausência de resposta à compressão da pata. Após trinta minutos, metade da dose anterior do cloridrato de dexroacetamina (Cristália, Brasil) foi novamente administrada por via intraperitoneal para manter o plano anestésico.

Os animais anestesiados foram colocados em decúbito dorsal sobre uma plataforma de aço, sendo presos a ela pelos incisivos superiores. A plataforma foi então elevada até um ângulo de 90° em relação à bancada e realizou-se suave tração da língua do animal para introdução do tubo orotraqueal (Jelco nº 16, Becton Dickinson, Reino Unido), com iluminação interna por feixe de luz de fibra óptica (Welch Allyn, Reino Unido). Visualizadas as cordas vocais, o jelco foi deslizado sobre a fibra óptica e introduzido cerca de 2 cm na traqueia. O correto posicionamento do tubo orotraqueal foi checado com auxílio de um dispositivo de detecção esofágica para pequenos animais. Confirmado o correto posicionamento do tubo orotraqueal, este foi fixado na porção proximal por fio seda 2.0, pré-cortado, sem agulha (Polysuture SP420, Brasil).

Ao término do procedimento de intubação orotraqueal, os animais foram colocados em decúbito dorsal, sobre uma cama aquecida (Heat Pad EFF422, Reino

Unido) para prevenção de hipotermia e acoplados ao ventilador (Inspira ASV – Harvard Apparatus, Estados Unidos da América).

Os animais foram ventilados no modo volume-controlado, com  $V_T$  de 35 ml/kg, PEEP de 0 cmH<sub>2</sub>O, frequência respiratória (FR) de 18 /min e FIO<sub>2</sub> de 100%, durante 1 hora. A seguir, eles foram desacoplados do ventilador e extubados. Os animais alocados para avaliação imediata após VILI (0-h) foram submetidos ao protocolo de eutanásia e remoção de órgãos, o qual será descrito a seguir. Os demais (4-h, 24, e 168-h) foram novamente alojados em gaiolas de polipropileno e mantidos em armários climatizados, com eutanásia e remoção de órgãos nos devidos tempos.

### 5.3.3 EUTANÁSIA E REMOÇÃO DE ORGÃOS

Nos períodos de tempo pré-determinados após VM (0-h, 4-h, 24-h e 168-h), os animais foram novamente pesados (Balança Filizola MF 4006033, Brasil), sedados e anestesiados com 80 mg/kg de cloridrato de dexroacetamina (Cristália, Brasil) e 8 mg/kg de xylazina (Ceva, Brasil), por via intraperitoneal. Estas doses foram suficientes para manter o animal em plano anestésico até eutanásia. Os animais alocados para eutanásia imediata, como ainda estavam sedados, receberam apenas metade da dose de dexroacetamina e xylazina.

Os animais anestesiados foram então colocados sob o foco cirúrgico, em decúbito dorsal, sobre uma cama aquecida (Heat Pad EFF422, Reino Unido) para prevenção de hipotermia. Os membros superiores foram fixados com fitas adesivas, em abdução a 90 graus em relação ao corpo, e os inferiores, estendidos

paralelamente ao corpo. Após posicionamento dos animais, foi realizada a tricotomia na face ventral do pescoço e, em sequência, foi realizada anestesia local com a injeção subcutânea de 0,3 ml de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Hipolabor, Brasil), seguida de uma incisão longitudinal medial, de aproximadamente 2 cm de extensão, na face ventral do pescoço, com a divulsão dos tecidos até a exposição completa do terço proximal da traqueia. A traqueostomia foi realizada com uma lâmina de bisturi número 23 (Maxicor, Brasil) e, imediatamente após, foi introduzida uma cânula de polietileno (PE 240, Intramedic<sup>®</sup>, Clay-Adams Inc., Estados Unidos da América), com 1,5 mm de diâmetro interno e 7,5 cm de comprimento, fixada na porção proximal por fio seda 2.0 estéril, pré-cortado, sem agulha (Polysuture SP420, Brasil).

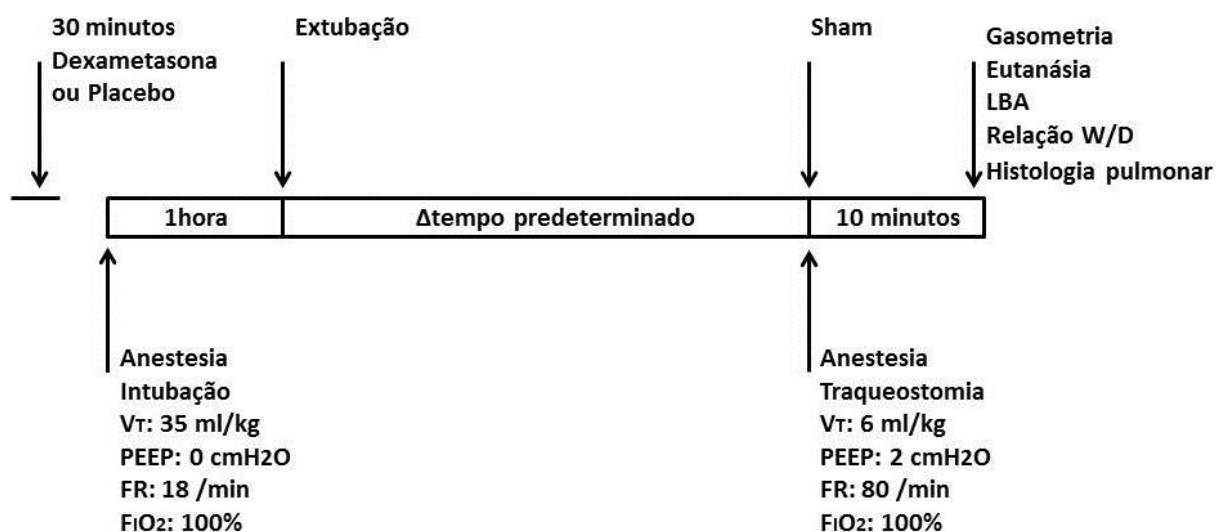
A artéria carótida comum esquerda também foi dissecada e canulada com um cateter de polietileno, 20 G (Arrow, Estados Unidos da América), com a finalidade de coletar sangue para a realização de gasometria arterial e infusão de medicamento.

Ao término dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em decúbito dorsal, sobre a cama aquecida (Heat Pad EFF422, Reino Unido), e receberam injeção intrarterial de brometo de rocurônio 0,5 mg/kg (Eurofarma, Brasil) para a obtenção de relaxamento muscular. Os animais foram então acoplados, através da traqueostomia, ao ventilador (Inspira ASV – Harvard Apparatus, Estados Unidos da America) e submetidos à ventilação mecânica protetora por 10 minutos, com o objetivo de estabilização. O modo ventilatório foi o volume-controlado, com  $V_T$  de 6 ml/kg, PEEP de 2 cmH<sub>2</sub>O, FR de 80 /min e FIO<sub>2</sub> de 100%.

Ao término da ventilação mecânica foi coletada a gasometria arterial e os animais foram eutanasiados por exsanguinação. Posteriormente, ocluiu-se a traqueia com fio cirúrgico seda 2.0 (Polysuture, Brasil), ao final da expiração e com

PEEP de 2 cmH<sub>2</sub>O. Imediatamente após, foi realizada uma incisão abdominal com ruptura do diafragma e secção da aorta. Prosseguindo, o tórax foi aberto, a parede torácica anterior removida e a porção abdominal do esôfago identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática Kelly (ABC, Brasil). As estruturas do pescoço foram dissecadas, permitindo a liberação das vias aéreas. A pinça presa ao esôfago foi suavemente tracionada para cima, permitindo separar o conjunto coração-pulmão das demais estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traqueia foi seccionada acima do local ocluído pelo fio cirúrgico e, posteriormente, o esôfago e o coração foram separados por leve tração, restando apenas os pulmões e as vias aéreas. O brônquio fonte direito e o brônquio para o lobo superior direito foram ocluídos com fio cirúrgico seda 2.0 (Polysuture, Brasil). No pulmão esquerdo foi realizado o lavado broncoalveolar. No pulmão direito, o lobo superior foi separado para posterior avaliação da relação peso úmido/peso seco e o lobo inferior foi separado para avaliação histopatológica. Os animais do grupo sham (n=6), que não receberam injeção intraperitoneal de dexametasona ou SF 0,9% e nem foram ventilados para indução de VILI, foram submetidos a este mesmo protocolo de ventilação mecânica por 10 minutos, eutanásia e remoção de órgãos. A figura 2 mostra a linha do tempo do experimento.

Figura 2. Linha do tempo do experimento



$F_{iO_2}$ : fração inspirada de oxigênio; FR: frequência respiratória; LBA: lavado broncoalveolar; PEEP: pressão positiva no final da expiração;  $V_T$ : volume corrente; W/D relação peso úmido / peso seco.

## 6 VARIÁVEIS ANALISADAS

### 6.1 TROCAS GASOSAS

Amostras de 0,3 ml de sangue arterial foram coletadas do cateter inserido na carótida por meio de uma seringa com heparina lítica (Sarstedt, Alemanha), imediatamente antes da eutanásia. O sangue coletado foi analisado pelo gasômetro (ABL90 Flex Radiometer, Dinamarca) com determinação da  $PaO_2$ , da  $PaCO_2$ , do bicarbonato ( $HCO_3$ ) e do pH.

## 6.2 RELAÇÃO PESO ÚMIDO/PESO SECO (W/D)

O edema pulmonar foi avaliado pela determinação da relação peso úmido/peso seco (W/D). Logo após a eutanásia e a retirada do pulmão, o lobo superior direito foi separado e pesado em balança de precisão (Ohaus Adventure, Brasil), sendo o resultado caracterizado como o peso úmido. A seguir, ele foi colocado dentro de um micro-ondas (Philco PMS22N3, China) ajustado para uma baixa potência (200 W), por cinco minutos, e pesado novamente. O processo de secagem foi repetido até que a diferença entre duas mensurações consecutivas fosse menor que 0,002 g. A última medida foi definida como sendo o peso seco, permitindo o cálculo da relação W/D (PETERSON; BROOKS; ZACK, 1982).

## 6.3 LAVADO BRONCOALVEOLAR

O lavado broncoalveolar foi realizado no pulmão esquerdo, infundindo e aspirando por três vezes 4,0 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo ácido etilenodiamino tetracético (10 nM). O fluido foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 4 °C (Sorvall, General Purpose, Estados Unidos da América).

A contagem total de leucócitos foi realizada em uma câmara de Neubauer sob microscópio óptico (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha), após a diluição das amostras em uma solução de Turk (2% ácido acético). O sedimento de células foi diluído em PBS e depois corado pela técnica de May-Grunwald para contagem diferencial de células, sendo esta feita sobre um mínimo de 300 células.

#### 6.4 HISTOPATOLOGIA DE DANO TECIDUAL PULMONAR

O lobo inferior do pulmão direito foi removido e fixado em formaldeído tamponado a 10% por 72 horas. Posteriormente, foi submetido a banhos em uma série crescente de álcool etílico e diafanizadas em xilol para posterior impregnação em parafina. Foram obtidos cortes transversais de 4  $\mu\text{m}$  de espessura do parênquima pulmonar, que, após montagem em lâminas de vidro, foram corados com hematoxilina-eosina para análise histopatológica.

Todas as lâminas foram analisadas por um mesmo patologista que não tinha conhecimento dos grupos experimentais, utilizando o microscópio de luz convencional (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha). Utilizou-se para esta análise o escore de lesão pulmonar preconizado pela *American Thoracic Society* (MATUTE-BELLO, G. et al., 2011), pelo qual avaliam-se os seguintes parâmetros: número de neutrófilos na parede e interstício alveolar (incluindo aqueles próximos aos capilares); número de neutrófilos no espaço alveolar; formação de membrana hialina; presença de debris protéico no espaço alveolar (como filamentos de fibrina); e espessura da parede alveolar. Para obtenção do escore avaliaram-se 20 campos diferentes de cada lâmina, em aumento de 400X, sendo que pelo menos 50% de cada campo deveria estar preenchido por alvéolos pulmonares. Os campos compostos predominantemente de brônquios ou grandes vasos foram excluídos da análise. Cada um dos cinco achados histológicos foi graduado de acordo com o esquema apresentado na tabela 1. Para gerar o escore, foi realizada a soma dos pontos obtidos em cada campo analisado, para cada uma das cinco variáveis independentes como mostrado na tabela 1. Estes pontos foram usados em uma



fórmula, que aplica pesos para cada variável, com base em sua relevância na caracterização da lesão pulmonar.

Tabela 1. Sistema de escore de lesão pulmonar preconizado pela *American Thoracic Society*.

Parâmetros	Escore por campo		
	0	1	2
A. Neutrófilos no espaço alveolar	Nenhum	1-5	>5
B. Neutrófilos no espaço intersticial	Nenhum	1-5	>5
C. Membrana hialina	Nenhum	1	>1
D. Debris protéico preenchendo o espaço aéreo	Nenhum	1	>1
E. Espessamento do septo alveolar	< 2x	2x-4x	>4x

Equação 1

$$\text{Escore} = \frac{[(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)]}{\text{Número de campos} \times 100}$$

## 6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou mediana (intervalo interquartil). Dentro de cada grupo, os dados paramétricos foram analisados pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett, quando necessário, e os não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney, quando necessário. A correção de Bonferroni foi aplicada para as

análises repetidas. Os grupos controle e dexametasona foram comparados, em cada tempo, pelos testes t não pareado e Mann-Whitney, conforme apropriado. O modelo de regressão de Cox foi utilizado para comparação de sobrevida entre o grupo controle e dexametasona. A diferença foi considerada estatisticamente significativa com resultado de  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc, Illinois, EUA).

## **7 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e a discussão serão apresentados sob a forma do artigo intitulado “*Protective Effect of Dexamethasone on Ventilator-Induced Lung Injury in Wistar Rats*”, (Apêndice A), o qual foi submetido à revista, *Critical Care Medicine* (Anexo B).

## 7.1 RESUMO DO ARTIGO

### **Protective effect of dexamethasone on ventilator-induced lung injury in Wistar rats**

Fernando F. Reis, MD<sup>1,2</sup>; Maycon M. Reboredo, PhD<sup>1,2</sup>; Leda M. F. Lucinda, PhD<sup>1,2</sup>; Aydra M. A. Bianchi, MSc<sup>1,2</sup>; Manfrinni V. A. Silva, MD<sup>1,2</sup>; Maria A. E. Rabelo, MD<sup>1</sup>; Lídia M. C. Fonseca, MD<sup>1,2</sup>; Júlio C. A. Oliveira, PhD<sup>1</sup>; Bruno V. Pinheiro, PhD<sup>1,2</sup>

1. Pulmonary Research Laboratory, Federal University of Juiz de Fora, Av. Eugênio do Nascimento - s/n<sup>o</sup>, Dom Bosco, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36038-330, Brazil

2. Center of Reproductive Biology, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Khelmer - s/n, Campus Universitário, São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36036-900, Brazil

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the effects of dexamethasone on the recovery of ventilator-induced lung injury (VILI), throughout seven days.

**Design:** Prospective, controlled, animal study.

**Setting:** University research laboratory.

**Subjects:** Adult male Wistar rats.

**Interventions:** The rats were allocated into two groups: dexamethasone (DG) or control (CG), according to the intraperitoneal administration of dexamethasone or saline. After 30 minutes, they were ventilated for one hour with the following settings: tidal volume ( $V_T$ ) of 35ml/Kg, respiratory rate (RR) of 18/min, PEEP of 0cmH<sub>2</sub>O, and F<sub>I</sub>O<sub>2</sub> of 100%. After extubation, they were allocated to be submitted to euthanasia immediately after the injurious ventilation, or at 4, 24 or 168 hours. Before euthanasia, they were anesthetized and ventilated for 10 minutes ( $V_T$ =6ml/kg, RR=80/min, PEEP=2cmH<sub>2</sub>O, F<sub>I</sub>O<sub>2</sub>=100%) for stabilization. A sham group (SG), that was not submitted to VILI, was ventilated for 10 minutes with the same settings, and analyzed for comparisons with the CG and DG groups.

**Measurements and Main Results:** VILI was observed in the CG, which presented a higher acute lung injury score compared to the SG, at 0h, 4h and 24h after ( $p < 0.05$ ). Dexamethasone decreased the lung injury, and the score in the DG was not significantly different from the SG, and was lower than the CG 4h and 24h ( $p < 0.05$ ). BAL neutrophil counts reached lower levels in DG, compared to CG at 4h and 24h ( $p < 0.05$ ). Dexamethasone also improved the oxygenation impairment that was seen in the CG immediately after the injurious MV.

**Conclusions:** In this model, dexamethasone decreased the inflammation and the

lung injury induced by mechanical ventilation with high  $V_T$ . These findings highlight the importance of the biotrauma in the VILI pathogenesis, and the necessity of carrying out researches on anti-inflammatory therapies to prevent and treat this condition.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Neste estudo, avaliamos o efeito da dexametasona na evolução da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica, pois apesar do conhecimento de que após a retirada do estímulo lesivo os pulmões tendem a se recuperar, ainda existem incertezas sobre os efeitos de medicações anti-inflamatórias nesta recuperação. Nossos resultados apontam para o benefício da dexametasona neste contexto, com redução do número de células inflamatórias no LBA, menor lesão pulmonar à histologia e por consequência melhora nas trocas gasosas. Apesar de algumas limitações, nossos resultados reforçam a importância do biotrauma na patogênese da VILI, e a necessidade do estudo de terapias anti-inflamatórias para prevenção e tratamento dessa condição.

## 9 CONCLUSÃO

Neste modelo experimental, a dexametasona reduziu a inflamação e a lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica com alto  $V_T$ , resultando em melhor oxigenação após a VILI.



## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. Neutrophils and acute lung injury. **Critical Care Medicine**, London, v. 31, n. 4 Suppl, p. S195-199, 2003.

ALBERT, R. K.; HUBMAYR, R. D. The prone position eliminates compression of the lungs by the heart. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 161, n. 5, p. 1660-1665, 2000.

AMATO, M. B. et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 338, n. 6, p. 347-354, 1998.

AMERICAN THORACIC, S.; INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF, A. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 171, n. 4, p. 388-416, 2005.

BARNES, P. J. Corticosteroid effects on cell signalling. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 27, n. 2, p. 413-426, 2006a.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2006. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 148, n. 3, p. 245-254, 2006b.

BIANCHI, Aydra Mendes Almeida. **Efeitos da ventilação em posição prona na lesão pulmonar aguda leve induzida por injeção de lipopolysaccharide intraperitoneal em ratos Wistar**. 2015. Dissertação (Mestrado em Saúde Brasileira) – Programa de Pós-Graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação; Conselho nacional de controle de experimentação animal – CONCEA. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos**. Brasília, DF, 2013.

BRIEL, M. et al. Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. **JAMA**, Chicago, v. 303, n. 9, p. 865-873, 2010.

BROWER, R. G. et al. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 351, n. 4, p. 327-336, 2004.

CAIRONI, P. et al. Time to generate ventilator-induced lung injury among mammals with healthy lungs: a unifying hypothesis. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 37, n. 12, p. 1913-1920, 2011.

CARLTON, D. P. et al. Lung overexpansion increases pulmonary microvascular protein permeability in young lambs. **Journal of Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 69, n. 2, p. 577-583, 1990.

CHIUMELLO, D. et al. Lung stress and strain during mechanical ventilation for acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 178, n. 4, p. 346-355, 2008.

CURLEY, G. F. et al. Evolution of the inflammatory and fibroproliferative responses during resolution and repair after ventilator-induced lung injury in the rat. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 115, n. 5, p. 1022-1032, 2011.

DAMASCENO, M. P. et al. Mechanical ventilation in Brazil: epidemiological aspects. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 219-228, 2006.

DE PROST, N.; DREYFUSS, D. How to prevent ventilator-induced lung injury? **Minerva Anesthesiology**, Torino, v. 78, n. 9, p. 1054-1066, 2012.

DE PROST, N. et al. Terbutaline lessens protein fluxes across the alveolo-capillary barrier during high-volume ventilation. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 34, n. 4, p. 763-770, 2008.

DE PROST, N.; SAUMON, G.; DREYFUSS, D. Modeling the time-course of ventilator-induced lung injury: what can we learn from interspecies discrepancies? **Intensive Care Medicine**, New York, v. 37, n. 12, p. 1901-1903, 2011.

DIAZ, M. C.; OSPINA-TASCON, G. A.; SALAZAR, C. B. Respiratory muscle dysfunction: a multicausal entity in the critically ill patient undergoing mechanical ventilation. **Archivos Bronconeumologia**, Barcelona, v. 50, n. 2, p. 73-77, 2014.

DOS SANTOS, C. C.; SLUTSKY, A. S. The contribution of biophysical lung injury to the development of biotrauma. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 68, p. 585-618, 2006.

DREYFUSS, D. et al. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. **The American Review of Respiratory Disease**, New York, v. 137, n. 5, p. 1159-1164, 1988.

DREYFUSS, D.; SAUMON, G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 157, n. 1, p. 294-323, 1998.

ESTEBAN, A. et al. Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. **JAMA**, Chicago, v. 287, n. 3, p. 345-355, 2002.

ESTEBAN, A. et al. How is mechanical ventilation employed in the intensive care unit? An international utilization review. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 161, n. 5, p. 1450-1458, 2000.

GAJIC, O. et al. Ventilator-induced cell wounding and repair in the intact lung. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 167, n. 8, p. 1057-1063, 2003.

GATTINONI, L. et al. Body position changes redistribute lung computed-tomographic density in patients with acute respiratory failure. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 74, n. 1, p. 15-23, 1991.

GATTINONI, L. et al. Physical and biological triggers of ventilator-induced lung injury and its prevention. **The European Respiratory Journal Supplement**, Copenhagen, v. 47, p. 15s-25s, 2003.

GATTINONI, L. et al. Ventilator-induced lung injury: the anatomical and physiological framework. **Crit Care Medicine**, New York, v. 38, n. 10 Suppl, p. S539-548, 2010.

HALBERTSMA, F. J. et al. Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. **The Netherlands Journal of Medicine**, Amsterdam, v. 63, n. 10, p. 382-392, 2005.

HASHEMIAN, S. M.; MOHAJERANI, S. A.; JAMAATI, H. R. Ventilator-induced lung injury. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 370, n. 10, p. 979-980, 2014.

HEGEMAN, M. A. et al. Dexamethasone attenuates VEGF expression and inflammation but not barrier dysfunction in a murine model of ventilator-induced lung injury. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e57374, 2013.

HEGEMAN, M. A. et al. Liposome-encapsulated dexamethasone attenuates ventilator-induced lung inflammation. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 163, n. 5, p. 1048-1058, 2011.

HELD, H. D. et al. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 163, n. 3 Pt 1, p. 711-716, 2001.

IMAI, Y. et al. Intratracheal anti-tumor necrosis factor-alpha antibody attenuates ventilator-induced lung injury in rabbits. **Journal of Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 87, n. 2, p. 510-515, 1999.

INGBER, D. Integrins as mechanochemical transducers. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 3, n. 5, p. 841-848, 1991.

ITO, Y. et al. Ventilation strategies affect surfactant aggregate conversion in acute lung injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 155, n. 2, p. 493-499, 1997.

IWASHITA, Y. et al. Thrombomodulin protects against lung damage created by high level of oxygen with large tidal volume mechanical ventilation in rats. **Journal of Intensive Care**, Cambridge, v. 2, n. 1, p. 57, 2014.

JIANG, J. S. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril attenuates ventilator-induced lung injury in rats. **Journal of Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 102, n. 6, p. 2098-2103, 2007.

KARASON, S. et al. Ventilator treatment in the Nordic countries. A multicenter survey. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 46, n. 9, p. 1053-1061, 2002.

KAWANO, T. et al. Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. **Journal of Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 62, n. 1, p. 27-233, 1987.

KIM, D. H. et al. Effect of a neutrophil elastase inhibitor on ventilator-induced lung injury in rats. **Journal of Thoracic Disease**, Hong Kong, v. 6, n. 12, p. 1681-1689, 2014.

KIM, S. H. et al. The volatile anesthetic sevoflurane attenuates ventilator-induced lung injury through inhibition of ERK1/2 and Akt signal transduction. **Korean Journal of Anesthesiology**, Seoul, v. 68, n. 1, p. 62-69, 2015.

LAI, T. S.; WANG, Z. H.; CAI, S. X. Mesenchymal Stem Cell Attenuates Neutrophil-predominant Inflammation and Acute Lung Injury in an In Vivo Rat Model of Ventilator-induced Lung Injury. **Chinese Medical Journal**, Beijing, v. 128, n. 3, p. 361-367, 2015.

MACCALLUM, N. S.; EVANS, T. W. Epidemiology of acute lung injury. **Current Opinion in Critical Care**, Hagerstown, v. 11, n. 1, p. 43-49, 2005.

MARINI, J. J. Mechanical ventilation: past lessons and the near future. **Critical Care**, London, v. 17 Suppl 1, p. S1, 2013.

MATHIEU-COSTELLO, O. et al. Pulmonary capillaries are more resistant to stress failure in dogs than in rabbits. **Journal of Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 79, n. 3, p. 908-917, 1995.

MATUTE-BELLO, G. et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals, **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v. 44, n. 5, p. 725-738, 2011.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 295, n. 3, p. L379-399, 2008.

MEAD, J.; TAKISHIMA, T.; LEITH, D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 28, n. 5, p. 596-608, 1970.

MEADE, M. O. et al. Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. **JAMA**, Chicago, v. 299, n. 6, p. 637-645, 2008.

MEDURI, G. U. et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. **Chest**, Park Ridge, v. 107, n. 4, p. 1062-1073, 1995.

MEDURI, G. U. et al. Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with unresolving acute respiratory distress syndrome: evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucocorticoids. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 165, n. 7, p. 983-991, 2002.

MERCAT, A. et al. Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. **JAMA**, Chicago, v. 299, n. 6, p. 646-655, 2008.

MONTGOMERY, A. B. et al. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. **The American Review of Respiratory Disease**, New York, v. 132, n. 3, p. 485-489, 1985.

MULLER, H. C. et al. Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. **Critical Care**, London, v. 14, n. 4, p. R143, 2010.

NARDELLI, L. M. et al. [Understanding the mechanisms of ventilator-induced lung injury]. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 469-474, 2007.

NIN, N. et al. Rats surviving injurious mechanical ventilation show reversible pulmonary, vascular and inflammatory changes. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 34, n. 5, p. 948-956, 2008.

NIN, N. et al. Ventilation-induced lung injury in rats is associated with organ injury and systemic inflammation that is attenuated by dexamethasone. **Critical Care Medicine**, New York, v. 34, n. 4, p. 1093-1098, 2006.

OHTA, N. et al. Glucocorticoid suppresses neutrophil activation in ventilator-induced lung injury. **Critical Care Medicine**, New York, v. 29, n. 5, p. 1012-1016, 2001.

PARK, W. Y. et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 164, n. 10 Pt 1, p. 1896-1903, 2001.

PARKER, J. C.; IVEY, C. L.; TUCKER, J. A. Gadolinium prevents high airway pressure-induced permeability increases in isolated rat lungs. **Journal of Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 84, n. 4, p. 1113-1118, 1998.

PELOSI, P. et al. Vertical gradient of regional lung inflation in adult respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 149, n. 1, p. 8-13, 1994.

PELOSI, P.; ROCCO, P. R. Effects of mechanical ventilation on the extracellular matrix. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 34, n. 4, p. 631-639, 2008.

PETERSON, B. T.; BROOKS, J. A.; ZACK, A. G. Use of microwave oven for determination of postmortem water volume of lungs. **Journal of Applied Physiology, Respiratory Environmental and Exercise Physiology**, Bethesda, v. 52, n. 6, p: 1661-3, 1982.

PINHU, L. et al. Ventilator-associated lung injury. **Lancet**, London, v. 361, n. 9354, p. 332-340, 2003.

PLATAKI, M.; HUBMAYR, R. D. The physical basis of ventilator-induced lung injury. **Expert Review of Respiratory Medicine**, London, v. 4, n. 3, p. 373-385, 2010.

PROTTI, A. et al. Lung stress and strain during mechanical ventilation: any safe threshold? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 183, n. 10, p. 1354-1362, 2011.

PUNEET, P.; MOOCHHALA, S.; BHATIA, M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 288, n. 1, p. L3-15, 2005.

QUINN, D. A. et al. Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury. **Journal of Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 93, n. 2, p. 517-525, 2002.

RANIERI, V. M. et al. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. **JAMA**, Chicago, v. 282, n. 1, p. 54-561, 1999.

REHLI, M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 375-378, 2002.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.

ROCCO, P. R.; DOS SANTOS, C.; PELOSI, P. Pathophysiology of ventilator-associated lung injury. **Current Opinion in Anaesthesiology**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 123-130, 2012.

SESSLER, C. N.; GAY, P. C. Are corticosteroids useful in late-stage acute respiratory distress syndrome? **Respiratory Care**, Dallas, v. 55, n. 1, p. 43-55, 2010.

SLUTSKY, A. S. Lung injury caused by mechanical ventilation. **Chest**, Park Ridge, v. 116, n. 1 Suppl, p. 9S-15S, 1999.

SLUTSKY, A. S.; RANIERI, V. M. Ventilator-induced lung injury. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 369, n. 22, p. 2126-2136, 2013.

SLUTSKY, A. S.; TREMBLAY, L. N. Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 157, n. 6 Pt 1, p. 1721-1725, 1998.

STUBER, F. et al. Kinetic and reversibility of mechanical ventilation-associated pulmonary and systemic inflammatory response in patients with acute lung injury. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 28, n. 7, p. 834-841, 2002.

SUKI, B. et al. Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. **Journal of Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 98, n. 5, p. 1892-1899, 2005.

TANG, B. M. et al. Use of corticosteroids in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Critical Care Medicine**, New York, v. 37, n. 5, p. 1594-1603, 2009.

THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME NETWORK. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 342, n. 18, p. 1301-1308, 2000.



THOMPSON, B. T. Corticosteroids for ARDS. **Minerva Anesthesiology**, Torino, v. 76, n. 6, p. 441-447, 2010.

THOMPSON, B. T. Glucocorticoids and acute lung injury. **Critical Care Medicine**, New York, v. 31, n. 4 Suppl, p. S253-257, 2003.

TREMBLAY, L. N. et al. Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 messenger RNA. **Critical Care Medicine**, New York, v. 30, n. 8, p. 1693-1700, 2002.

TREMBLAY, L. N.; SLUTSKY, A. S. Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma. **Proceeding of the Association of American Physicians**, Cambridge, v. 110, n. 6, p. 482-488, 1998.

TSUNO, K.; PRATO, P.; KOLOBOW, T. Acute lung injury from mechanical ventilation at moderately high airway pressures. **Journal Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 69, n. 3, p. 956-961, 1990.

TUCCI, M. R.; BERALDO M. A.; COSTA E.L.V. Lesão pulmonar induzida pelo ventilador. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3, p. 43-48, 2011.

UHLIG, S.; UHLIG, U. Pharmacological interventions in ventilator-induced lung injury. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 25, n. 11, p. 592-600, 2004.

VASSILAKOPOULOS, T.; PETROF, B. J. Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 169, n. 3, p. 336-341, 2004.

WALDER, B. et al. Time and tidal volume-dependent ventilator-induced lung injury in healthy rats. **European Journal of Anaesthesiology**, Oxford, v. 22, n. 10, p. 785-794, 2005.

WARNER, A. E. Pulmonary intravascular macrophages. Role in acute lung injury. **Clinics in Chest Medicine**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 125-135, 1996.

WEBB, H. H.; TIERNEY, D. F. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. **The American Review of Respiratory Disease**, New York, v. 110, n. 5, p. 556-565, 1974.

WILSON, M. R.; CHOUDHURY, S.; TAKATA, M. Pulmonary inflammation induced by high-stretch ventilation is mediated by tumor necrosis factor signaling in mice. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 288, n. 4, p. L599-607, 2005.

## APÉNDICES

**APÊNDICE A – Artigo**

## ANEXOS

**ANEXO A - COMPROVANTE DO PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NA  
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA).**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PRO-REITORIA DE PESQUISA**  
Comissão de Ética no Uso de Animais

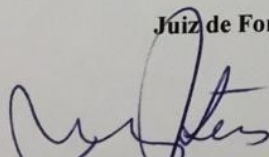
**CERTIFICADO**

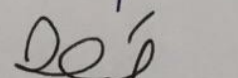
Certificamos que o Protocolo nº 035/2013 – CEUA sobre “ESTUDO PILOTO DO EFEITO PROTETOR DA DEXAMETASONA NA LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA EM RATOS WISTAR” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de MAYCON DE MOURA REBOREDO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 13/08/2013. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 48 ratos (48 machos), da linhagem Wistar, conforme solicitado e que serão entregues no período de 01/09/2013 a 01/02/2014.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 035/2013- CEUA about “ESTUDO PILOTO DO EFEITO PROTETOR DA DEXAMETASONA NA LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA EM RATOS WISTAR” under responsibility of MAYCON DE MOURA REBOREDO - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 13/08/2013. For the development of this research 48 rats (48 males) of Wistar lineage, were released, as requested and they will be delivered in the period of 01/09/2013 to 01/02/2014.

Juiz de Fora, 15 de Agosto de 2013.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente/CEEA

  
\_\_\_\_\_  
Secretário/CEEA

**ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO**

Critical Care Medicine

Protective Effect of Dexamethasone on Ventilator Induced Lung Injury in Wistar Rats

--Manuscript Draft--

Manuscript number: CCMED-D-15-01321

Full Title: Protective Effect of Dexamethasone on Ventilator Induced Lung Injury in Wistar Rats

Article Type: Online Laboratory Investigation

Keywords: ventilator-induced lung injury; acute respiratory distress syndrome; acute lung injury;

dexamethasone; corticosteroids; experimental model

Corresponding Author: Fernando Fonseca Reis, M.D.

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, Minas Gerais BRAZIL

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Juiz de Fora

First Author: Fernando Fonseca Reis, M.D.

Order of Authors: Fernando Fonseca Reis, M.D.

Maycon Reboredo

Leda Lucinda

Aydra Bianchi

Manfrinni Silva

Maria Rabelo

Lídia Fonseca

Júlio Oliveira

Bruno Pinheiro

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

**De:** "Critical Care Medicine" <[em@editorialmanager.com](mailto:em@editorialmanager.com)>

**Data:** 12 de julho de 2015 19:30:31 BRT

**Para:** "Fernando Fonseca Reis" <[fernandocajuri@yahoo.com.br](mailto:fernandocajuri@yahoo.com.br)>

**Assunto:** **CCMED Submission Confirmation for Protective Effect of Dexamethasone on Ventilator Induced Lung Injury in Wistar Rats**

**Responder A:** "Critical Care Medicine" <[journals@sccm.org](mailto:journals@sccm.org)>

Jul 12 2015 06:30:31:276PM

Dear Dr. Reis,

Your submission entitled "Protective Effect of Dexamethasone on Ventilator Induced Lung Injury in Wistar Rats" has been received by the journal editorial office.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. Additionally, you may view the Additional Information questions to obtain the copyright information by clicking here: 1. Fernando Fonseca Reis, M.D.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind Regards,

Critical Care Medicine