

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO INALATÓRIO ASSOCIADO À
VENTILAÇÃO MECÂNICA PROTETORA NA LESÃO PULMONAR
AGUDA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE

FÁBIO JOLY CAMPOS

BOTUCATU

2011

FÁBIO JOLY CAMPOS

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO INALATÓRIO ASSOCIADO À
VENTILAÇÃO MECÂNICA PROTETORA NA LESÃO PULMONAR
AGUDA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Adjunto José Roberto Fioretto

BOTUCATU

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Campos, Fábio Joly

Efeito do óxido nítrico inalatório associado à ventilação mecânica protetora na lesão pulmonar aguda induzida experimentalmente / Fábio Joly Campos. - Botucatu, 2011.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: José Roberto Fioretto

Capes: 40101126

1. Ventilação mecânica - Estudos experimentais 2. Síndrome do desconforto respiratório agudo

Palavras-chave: Coelhos; Lesão oxidativa; Lesão pulmonar; SDRA; Ventilação mecânica

Dedico esse trabalho

À minha querida **Claudia** que está comigo há 11 anos e durante todo esse período tem contribuído decisivamente para eu me tornar uma pessoa melhor. Ela ensinou-me como é possível amar incondicionalmente, sem ela minha vida não teria brilho.

À meus pais **Gregório** e **Madalena** que me mostraram o caminho e sempre foram exemplos para mim. Sem seu apoio e orientação não teria chegado aonde cheguei.

À meus irmãos **Fernando** e **Beatriz** por estarem sempre a meu lado nos bons e maus momentos, sempre soube que estariam lá para me ajudar e aconselhar.

À meu mestre, orientador, amigo e exemplo que sempre procurei seguir **José Roberto Fioretto**. Sem seus ensinamentos e orientações esse trabalho não seria possível. A sua colaboração na minha formação vai muito além desse trabalho.

Agradecimentos

Agradeço a **Dra. Cilmery Suemi Kurokawa**, professora colaboradora e responsável pelo Laboratório Experimental do Departamento de Pediatria-UNESP pela ajuda no desenvolvimento de toda a parte experimental. Suas orientações, ajuda e conselhos foram imprescindíveis.

A meus amigos e antigos mestres a disciplina de Medicina Intensiva Pediátrica: **Dr. Rossano César Bonatto**, **Dr. Mário Ferreira Carpi** e **Dr. Marcos Aurélio de Moraes**, por toda a ajuda na realização deste trabalho.

Ao meu amigo **Carlos Fernando Ronchi** que me ajudou muito em todas as etapas desse trabalho.

A todos os meus amigos diaristas e plantonistas da UTI Pediátrica e do Pronto Socorro da Faculdade de Medicina de Marília, que se desdobraram para cobrir minhas ausências.

Aos funcionários do Laboratório Experimental do Departamento de Pediatria-UNESP que colaboraram na realização de toda a parte experimental.

A **Carlos Roberto Padovani**, Professor Titular do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências do Câmpus de Botucatu –UNESP, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À **Prof. Adjunta Dra. Ana Lucia dos Anjos Ferreira**, docente do Departamento de Clínica Médica-UNESP, pelas orientações e ensinamentos.

Aos alunos e bolsistas que acompanharam e colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

	Páginas
Resumo/Abstract.....	01
1- Introdução.....	03
2- Materiais e Métodos.....	07
2.1 Obtenção, preparo e aleatorização dos animais.....	7
2.2 Instalação de modelo de lesão pulmonar aguda.....	9
2.3 Administração de óxido nítrico.....	10
2.4 Formação dos grupos experimentais.....	10
2.5 Manipulação dos pulmões e histologia pulmonar.....	11
2.6 Curvas pressão-volume.....	12
2.7 Contagem de células polimorfonucleares no líquido de lavagem Pulmonar.....	12
2.8 Medida da concentração de TNF-alfa no líquido de lavagem Pulmonar.....	13
2.9 Determinação do estresse oxidativo pulmonar.....	13
2.10 Determinação dos níveis plasmáticos dos subprodutos do óxido nítrico.....	14
2.11 Variáveis analisadas.....	14
2.12 Análise estatística.....	15
3- Resultados	15
3.1 Hemodinâmica, mecânica pulmonar e trocas gasosas.....	18
3.2 Inflamação: Contagem de células no lavado broncoalveolar.....	29
3.3 Lesão histopatológica.....	30
3.4 Fator de Necrose Tumoral-alfa.....	30
3.5 Estresse oxidativo.....	31
4- Discussão	32
4.1 Escolha dos animais.....	32
4.2 Manipulação dos animais.....	32
4.3 Características gerais do grupo.....	33

4.4 Modelo de lesão pulmonar aguda.....	33
4.5 Resposta ao óxido nítrico inalatório.....	36
5- Conclusões	38
6- Referências Bibliográficas.....	38

Resumo

Fundamentação/Objetivos: Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) cursa com elevada taxa de mortalidade a despeito do melhor entendimento de sua fisiopatologia e recentes avanços no tratamento. Ventilação mecânica (VM), uma das mais importantes formas de tratamento, é baseada na utilização de estratégias protetoras com baixo volume corrente (VC) e elevada pressão expiratória final positiva (PEEP). Existem várias terapias adjuvantes, entre as quais o óxido nítrico inalatório (NOi) é conhecido por suas propriedades antiinflamatórias e efeitos benéficos sobre a oxigenação. Quando o NOi é associado à VM protetora, o gás poderia não apenas melhorar a oxigenação mas também reduzir a lesão pulmonar. Objetivo: comparar a VM protetora, com e sem NOi, quanto a oxigenação, estresse oxidativo do tecido pulmonar e lesão histológica e inflamatória dos pulmões. Métodos: Trinta coelhos foram instrumentados com traqueotomia e acessos vasculares e ventilados com FiO_2 de 1,0. Lesão pulmonar aguda (LPA) foi induzida por infusão traqueal de salina aquecida (30mL/Kg, 38°C) e o estresse oxidativo do tecido pulmonar foi medido pelo método da capacidade antioxidante total (TAP). A inflamação pulmonar foi avaliada pelo contagem do número de células polimorfonucleares (PMN) recuperadas do fluido de lavagem broncoalveolar (BAL). Também foi analisado um escore de lesão pulmonar histopatológica. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos, cada um dos quais com 10 coelhos: a) Controle (GC): baixo VC (6mL/Kg) e PEEP de 5cmH₂O; b) ventilação mecânica protetora + LPA (GVM): baixo VC (6mL/Kg) e PEEP de 10cmH₂O; e c) ventilação mecânica protetora + LPA + NOi (GVM-NO): baixo VC (6mL/Kg), PEEP de 10cmH₂O, e NOi de 5ppm.; d) Dez animais não instrumentados e não ventilados mecanicamente, grupo sadio (GSadio), foram estudados para o TAP. Pressão de platô foi limitada em 30 cmH₂O para todos os grupos no modo pressão regulada/volume controlado. Parâmetros ventilatórios e hemodinâmicos foram registrados a cada 30 minutos durante quatro horas. Foi utilizado nível de significância de 5%. Resultados: Depois da indução, os grupos com LPA apresentaram comportamento semelhante, mas piores do que o GC para a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (GC:438±87>GVM:80±13=GVM-NO:81±24;p<0,05) e complacência pulmonar (GC:4,3±1,3>GVM:1,4±0,3=GVM-NO:1,3±0,2 mL/Kg/cmH₂O;p<0,05). O número de PMN recuperados do BAL foi maior no GVM que no GC e no GVM-NO (GVM: 4,80±1,64 > GC: 0,16±0,15 = GVM-NO: 0,96±0,35 número de PMN x 10⁶/pulmão; p<0,05). O escore de lesão histológica foi significativamente maior nos grupos com lesão que no GC, sendo maior no GVM que no GVM-NO [(GVM: 5 (1-16)>GVM-NO:2 (0-5)>GC: 0 (0-3); p<0,05)]. O TAP do GVM-NO foi mais elevado (maior proteção) que do GVM, sendo que nos grupos com lesão os valores foram mais baixos que no GSadio e GC (GSadio:68±8,7=GC:66,4±6,8>GVM-NO:56,3±5,1>GVM:45,9±3,4 % proteção/g proteína; p<0,05). Conclusões: Óxido nítrico inalatório reduz a lesão pulmonar inflamatória e histopatológica e atenua a lesão oxidativa do tecido pulmonar em modelo de LPA induzida por lavagem alveolar com salina aquecida em coelhos submetidos a ventilação mecânica protetora.

Fomento: FAPESP processos: 2007/03173-2 e 2008/55431-8; bolsa CNPq/PIBITI - 115242/2008.

Abstract

Background/Objectives: Acute respiratory distress syndrome (ARDS) has been associated with high mortality rate despite better understanding of its pathophysiology and recent advances in treatment. Mechanical ventilation (MV), one of the most important treatments, is based on using protective strategies with low tidal volume (V_T) and high positive end expiratory pressure (PEEP). There are also many adjunctive therapies, of which inhaled nitric oxide (iNO) is known for its antiinflammatory properties and positive effects on oxygenation. When iNO is associated with protective MV, it could not only improve oxygenation but may also reduce lung injury. Objective: to compare protective MV with and without iNO for oxygenation, lung oxidative stress, inflammatory and histopathological injury. Methods: Thirty rabbits were instrumented with a tracheotomy and vascular catheters and ventilated at FiO_2 1.0. Acute lung injury (ALI) was induced by tracheal infusion of warm saline (30mL/Kg, 38°C), lung oxidative stress was assessed by total antioxidant performance (TAP) assay, and pulmonary inflammation was assessed by counting of the number of polymorphonuclear leukocyte (PMN) in bronchoalveolar lavage fluid (BAL). Histopathological lung injury was assessed by a lung injury score. Animals were assigned to groups: a) Control (CG): low tidal volume (6mL/Kg) and PEEP 5cmH₂O; b) ALI without iNO (LIG): low tidal volume (6mL/Kg) and PEEP 10cmH₂O; and c) ALI with iNO (LINO): low tidal volume (6mL/Kg), PEEP 10cmH₂O, and iNO 5ppm; d) Ten rabbits were studied for oxidative stress analysis without ALI and MV, healthy group (HG). Ventilatory and hemodynamic parameters were recorded every 30 minutes for 4 hours. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Results: After induction, ALI groups were similar but worse than CG for PaO_2/FiO_2 (CG:438±87>LIG:80±13=LINO:81±24; $p < 0.05$) and pulmonary compliance (CG:4.3±1.3>LIG:1.4±0.3=LINO:1.3±0.2 mL/Kg/cmH₂O; $p < 0.05$). PMN leukocyte number recovered from the BAL was greater in LIG than CG and LINO [(LIG: 4.80±1.64 >CG: 0.16±0.15 = LINO: 0.96±0.35 number of PMN $\times 10^6$ /lung; $p < 0.05$)]. LIG and LINO showed higher histopathological injury score compared to CG, being LIG higher than LINO [(LIG: 5 (1-16)>LINO:2 (0-5)> CG: 0 (0-3); $p < 0.05$]. TAP was greater for LINO compared with LIG, being both treated groups smaller than HG and CG (HG:68±8.7=CG:66.4±6.8>LINO:56.3±5.1>LIG:45.9±3.4 % protection/g protein; $p < 0.05$). Conclusions: Inhaled nitric oxide reduces lung histological and inflammatory injury and attenuates pulmonary tissue oxidative injury in a saline-lavaged rabbit model of ALI under protective mechanical ventilation.

Support: FAPESP process: 2007/03173-2 e 2008/55431-8; bolsa CNPq/PIBITI - 115242/2008.

1. Introdução

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) caracteriza-se por processo inflamatório que leva à quebra da barreira alvéolo-capilar com desenvolvimento de edema intersticial e alveolar, diminuição da complacência pulmonar, hipertensão pulmonar, desequilíbrio da relação ventilação/perfusão e hipoxemia refratária à administração de oxigênio^{1,2}.

A ventilação mecânica (VM) constitui um dos pilares do tratamento da SDRA, sendo fundamental sua utilização minimizando o risco de lesão pulmonar, a chamada VM protetora, juntamente com a estratégia de manter os pulmões abertos^{3,4}. Estes métodos baseiam-se no emprego de volume corrente baixo (< 6 mL/Kg), com pressão expiratória final positiva (PEEP) elevada, pressão de platô \leq 30 cmH₂O, permitindo hipercapnia e hipoxemia. Diversos estudos clínicos demonstraram melhora na sobrevida, diminuição na frequência de barotrauma e diminuição da liberação de citocinas inflamatórias sistêmicas quando o modo protetor foi utilizado^{4,5}. Em oposição, estudos experimentais demonstraram que a ventilação não protetora causa superdistensão alveolar, reabertura cíclica e estiramento alveolar e ruptura da integridade superficial do alvéolo com conseqüente escape de ar para o interstício, elementos que caracterizam a lesão pulmonar induzida pela VM (LPIVM)⁶⁻⁸.

A complexidade fisiopatológica e a gravidade de alguns casos de SDRA exigem a utilização de outras estratégias de tratamento além da VM. Assim é que o tratamento clínico da síndrome inclui controle da infecção subjacente, controle hidreletrolítico e do estado hemodinâmico, suporte nutricional e otimização da VM protetora. Quando a hipoxemia persiste ou se agrava, terapias adjuvantes, como o óxido nítrico inalatório (NOi) podem ser utilizadas⁹.

Levando-se em consideração a fisiopatologia da SDRA, entende-se que a administração de drogas vasodilatadoras seria útil. No entanto, os vasodilatadores intravenosos sistêmicos disponíveis não apresentam especificidade para o leito

vascular pulmonar e podem reduzir a pressão arterial sistêmica, agravando ainda mais o *shunt* intrapulmonar por vasodilatação não seletiva de artérias que perfundem áreas pulmonares mal ventiladas, com piora da relação ventilação/perfusão nestas áreas e diminuição da oxigenação¹⁰. Assim é que o NOi, potente vasodilatador pulmonar com efeitos que se limitam a áreas pulmonares bem ventiladas (efeito seletivo), pode ser útil no tratamento da SDRA. O gás, sendo rapidamente inativado na circulação, ao se ligar a hemoglobina, não tem efeitos sistêmicos indesejáveis. O resultado é a melhora da relação ventilação/perfusão com conseqüente diminuição do *shunt* intrapulmonar e melhora da oxigenação¹¹.

Já está estabelecido que a resposta clínica ao NOi depende do momento de sua introdução e do grau de abertura dos alvéolos e que sua ação clínica é tanto maior quanto maior for o grau de abertura de unidades alveolares^{12,13}. Além do momento da introdução do NOi, a estratégia ventilatória empregada também é fundamental. Fioretto et al., em 2004¹², analisaram os efeitos da administração precoce de NOi na SDRA comparando um grupo composto de crianças seguidas prospectivamente e que recebeu NOi associado à VM protetora com um grupo de pacientes que não utilizou o gás. Os autores demonstraram que no grupo com o NOi houve melhora da oxigenação, redução mais precoce dos parâmetros ventilatórios associados com LPIVM e diminuição da mortalidade. Foi levantada a hipótese de que o emprego do NOi reduziu a agressividade da VM e atenuou o processo inflamatório, fatores que podem ter contribuído para a diminuição da mortalidade.

Apesar destas modalidades de tratamento levarem em consideração importantes conhecimentos da fisiopatologia da SDRA, vale o destaque de que a patogênese da síndrome ainda é um vasto campo de investigação em curso. Assim é que, mais recentemente¹⁴, foi demonstrado que as espécies reativas de oxigênio (EROs) têm sido implicadas na lesão vascular endotelial pulmonar, a qual pode ser responsável pelas manifestações clínicas e pela evolução da SDRA^{15,16}.

Especificamente, EROs são moléculas que incluem íons oxigênio, radicais livres (hidroxil e OH⁻) e peróxidos (O₂⁻) formadas como subproduto do metabolismo

normal do oxigênio, podendo aumentar dramaticamente em situações de estresse e por estimulação de mediadores inflamatórios¹⁷. O aumento das EROs pode resultar em significativa lesão celular, por meio de dano ao DNA, oxidação de ácidos graxos em lípidos, oxidação de aminoácidos e inativação enzimática¹⁴. A vulnerabilidade das moléculas-alvo, compartimentos celulares e sistemas orgânicos às EROs depende da capacidade local de redução, ou seja, da capacidade antioxidante. Em condições normais, a produção de agentes oxidantes é contrabalançada pela atividade antioxidante¹⁸.

Há relatos de que pacientes com SDRA apresentam baixas concentrações plasmáticas de antioxidantes¹⁹ e elevados níveis de peróxido de hidrogênio no ar exalado e na urina²⁰. Além disso, os níveis do sistema antioxidante de defesa, superóxido dismutase e catalase, tanto quanto de outros “removedores”, como glutathione e vitaminas E e C, diminuem com o aumento dos níveis das EROs²¹. Citocinas e moléculas de adesão, que se expressam durante a síndrome, podem, também, mediar a produção de EROs e, por isso, levar a dano adicional. A inflamação é característica da síndrome, tanto que elevadas concentrações de TNF-alfa e interleucina-1 β têm sido detectadas no lavado broncoalveolar de pacientes com SDRA²².

Na SDRA e na LPA, leucócitos ativados e agregados na microvasculatura pulmonar liberam EROs, as quais podem atacar a membrana de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), iniciando o processo de peroxidação. Este processo leva a perda da integridade funcional da membrana celular, aumentando agudamente a permeabilidade alvéolo-capilar. Além disso, linfócitos ativados estimulam o fator de necrose tumoral (TNF) e outras citocinas. Estes linfócitos aumentam a geração de radicais livres pelos leucócitos, macrófagos e outras células, as quais podem, em última análise, produzir a SDRA²³.

A partir do exposto, entende-se que a patogênese da SDRA envolve aumento da produção de EROs e possível diminuição dos níveis de antioxidantes^{24,25}.

Quanto a participação do NOi no metabolismo oxidativo, alguns pontos merecem destaque. Apesar dos potenciais efeitos benéficos do óxido nítrico (NO), é intuitivo pensar que o gás possa influenciar o metabolismo oxidativo do organismo. Na verdade, o gás não é destituído de efeitos tóxicos, podendo ser oxidado a dióxido de nitrogênio (NO₂), potente agente oxidante. Se altas concentrações de NOi (>100 ppm) forem administradas juntamente com altas concentrações inspiradas de oxigênio, a reação de oxidação será acelerada. O nível superior de exposição humana aceitável é de 2 ppm para o NO₂. A dose estimada de NO₂ que em uma hora resulta em 50% de mortalidade (LD50) em humanos é de 174 ppm^{26,27}.

O NO pode, também, reagir com o ânion superóxido (O₂⁻) para produzir peroxinitrito (ONOO⁻), outro potente oxidante e mediador pró-inflamatório. O peroxinitrito endógeno tem papel importante na destruição de microorganismos e células tumorais. Entretanto, o peroxinitrito exógeno ou endógeno em excesso nos pulmões tem efeitos adversos potenciais, incluindo alteração do surfactante, mudanças estruturais macromoleculares, lesão metabólica e indução de apoptose²⁸⁻³⁰. A substância é irritante pulmonar e inibidora irreversível da função mitocondrial. Destroi surfactante, por peroxidação lipídica, impede a produção de surfactante adicional por intoxicação mitocondrial dos alvéolos tipo II³¹ e pode, conseqüentemente, aumentar a tendência ao colapso alveolar. O peroxinitrito também lesa o endotélio pulmonar^{32,33} e pode comprometer profundamente a produção de NO endógeno, levando a hipertensão pulmonar e ao aprisionamento de células circulantes na circulação pulmonar³⁴.

Há na literatura, dados conflitantes sobre o papel do NOi na reação inflamatória pulmonar, com estudos indicando ambos, aumento e diminuição da liberação de mediadores inflamatórios³⁵⁻³⁸. Esta controvérsia está relacionada, provavelmente, com a dose do NOi, seu potencial oxiredutor local e com a presença de outros mediadores inflamatórios e radicais livres derivados do oxigênio³⁹. Sabe-se, também, que o NOi não diminui a resposta inflamatória quando a inflamação já está em processo e pode aumentar a peroxidação lipídica, como descrito

anteriormente. Entretanto, seu uso em dose baixa e precoce ou até mesmo antes da inflamação pode atenuar o processo inflamatório pulmonar e extra-pulmonar¹⁴. Em modelo de inflamação pulmonar induzida por *bypass* cardiopulmonar agudo em porcos, o NOi modulou a reação inflamatória pulmonar prevenindo a resposta pulmonar vasoativa e a produção de mediadores inflamatórios intermediários, como a matriz de metaloproteinase⁴⁰. Também, o NOi preveniu a hipertensão pulmonar depois de reparo de cardiopatia congênita em humanos^{41,42}.

Até onde pudemos constatar, não há estudo que tenha comparado o efeito da VM protetora, associada ou não ao NOi, sobre o estresse oxidativo pulmonar. Assim, considerando as características protetoras da VM e os efeitos vasodilatadores e antiinflamatórios do NOi, nossa hipótese é que a somatória de efeitos benéficos desta estratégia de VM e do NOi, em baixa dose e utilizado precocemente, determina menos lesão inflamatória, histopatológica e oxidativa do pulmão quando comparada com VM protetora isolada.

O objetivo do estudo foi comparar a VM protetora convencional com e sem NOi quanto a oxigenação, lesão inflamatória, histológica e oxidativa dos pulmões.

2. Materiais e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP (protocolo n° 600) e realizado no Laboratório Experimental de Fisiologia Pulmonar do Centro de Pesquisa Clínica e Experimental do Departamento de Pediatria-UNESP.

2.1 Obtenção, Preparo e Aleatorização dos Animais

Estudo prospectivo, controlado, *in vivo* e em animais de laboratório. Foram utilizados coelhos jovens brancos da raça Botucatu, fornecidos pelo Biotério da UNESP-Campus de Botucatu, com peso corporal variando entre 2,0 Kg e 3,0 Kg.

Após pesagem, os animais foram anestesiados e sedados com solução de cetamina (50 mg/Kg) e acepromazina (2 mg/Kg) administrados por via intramuscular. Posteriormente, os animais foram colocados em goteira cirúrgica, receberam oxigênio a 100% por meio de cateter nasal e foram submetidos à tricotomia cervical e torácica para colocação de eletrodos para monitoração da frequência cardíaca (FC). Se a FC diminuísse para valores abaixo de 180 batimentos por minuto, era administrada atropina na dose de 0,01 mg/Kg por via intravenosa na veia auricular. A região anterior do pescoço dos animais foi anestesiada com xilocaína 2% para traqueotomia, dissecação da artéria carótida e veia jugular interna. Pela traqueotomia foi introduzido tubo traqueal de maior calibre possível (diâmetro interno de 3,0 a 3,5 mm, *Portex, Hythe, UK*), mantido em posição por meio de fita cirúrgica. Imediatamente, iniciou-se a ventilação mecânica com o aparelho Galileo Gold (*Hamilton Medical AG, Suíça*) com os seguintes parâmetros: frequência respiratória (FR) de 30 a 50 ciclos por minuto, ajustada de acordo com a PaCO₂, mantendo seus níveis entre 35-45 mmHg; tempo inspiratório (Ti) de 0,5 segundo; PEEP de 5 cmH₂O; fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de 1,0; e volume corrente alvo de 6 mL/Kg no modo pressão regulada/volume controlado. Estes parâmetros foram mantidos por um período de estabilização de 15 minutos até o momento da indução da lesão pulmonar aguda nos grupos de estudo. Em seguida, o único parâmetro do ventilador que foi modificado até o final do experimento foi a PEEP.

Após a traqueotomia, foram introduzidos um cateter de lúmen único (22 Gauge Jelco, *Introcan® Safety™ - B-Braun, Melsungen, Germany*) na artéria carótida e um cateter de duplo lúmen (5^{Fr.} - *Arrow International Inc., Reading, Philadephia-USA*) na veia jugular interna até a junção entre o átrio direito e a veia cava superior. O cateter arterial foi utilizado para obtenção de gasometrias e para monitoração contínua da pressão arterial média (PAM) com auxílio de um sistema de monitoração de pressão (*LogiCal® da Medex, Dublin, USA*) conectado a monitor multiparamétrico (*Dixtal®, Manaus, Brasil*). O cateter na veia cava foi utilizado

para administração de sedativos em infusão contínua, soro de manutenção e drogas vasoativas.

A anestesia foi mantida por meio de administração intravenosa contínua de 10 mg/Kg/h de cetamina até a conclusão do experimento. Além disso, os animais foram submetidos a bloqueio neuromuscular por meio da administração intravenosa de 0,2 mg/Kg de pancurônio. Doses adicionais de 0,1 mg/Kg a cada 30 a 45 minutos foram utilizadas para manter a curarização. Em qualquer momento do experimento, caso a PAM atingisse valores inferiores a 50 mmHg, iniciava-se infusão intravenosa contínua de noradrenalina em dose inicial de 0,5 µg/Kg/min e, em não havendo resposta, a dose era aumentada até 2 µg/Kg/min. A necessidade de suporte inotrópico foi avaliada por meio de um escore de medicações vasoativas e inotrópicas: $10 \times \text{dose milrinone } (\mu\text{g/kg/min}) + 10.000 \times \text{dose vasopressina } (\text{U/kg/min}) + 100 \times \text{dose norepinefrina } (\mu\text{g/kg/min})^{43}$. Durante o experimento, a temperatura corporal foi monitorada com o auxílio de um termômetro digital por via retal, sendo mantida entre 38°C e 40°C com auxílio bolsas térmicas e a volemia foi mantida por meio de infusão contínua de 4 mL/Kg/h de solução salina acrescida de 5% de dextrose.

2.2 Instalação do Modelo de Lesão Pulmonar Aguda

A lesão pulmonar aguda (LPA) foi induzida conforme técnica descrita em outros estudos⁴⁴⁻⁴⁶. Resumidamente, através da cânula traqueal foram realizadas lavagens sucessivas do pulmão com salina aquecida entre 37°C e 38°C em alíquotas de 30 mL/Kg, a uma pressão máxima de 30 cmH₂O. Cada procedimento de lavagem tinha duração de 60 segundos, sendo 20 segundos reservados para infusão e o tempo restante para retirada, realizada por gravidade, movimentos externos de compressão torácica e gentil sucção. Completada a retirada, o procedimento foi repetido a cada 3 – 5 minutos até o critério de definição de LPA ser atingido (relação PaO₂/FiO₂ < 200 mmHg). Atingido este critério, uma gasometria foi repetida após 5 minutos, para confirmar o estabelecimento da lesão pulmonar, sendo este momento denominado

tempo zero de avaliação para os grupos experimentais correspondentes. Se esta gasometria não confirmasse a relação $PaO_2/FiO_2 < 200$ mmHg, a lavagem pulmonar era reiniciada, sendo realizadas reavaliações da relação PaO_2/FiO_2 a cada duas lavagens.

2.3 Administração de Óxido Nítrico Inalatório

A administração de NOi seguiu normas anteriormente descritas pelo grupo⁴⁷, sendo a dose de 5 ppm mantida ao longo do experimento. Resumidamente, o gás misturado com nitrogênio foi obtido a partir de tanques de 20L, conectados a um regulador de pressão (White Martins Gases Industriais - *Praxair*, Rio de Janeiro, Brasil). A concentração nos tanques foi certificada pelo fornecedor como sendo 300 partes por milhão (ppm) de óxido nítrico em nitrogênio. A fração de NOi foi continuamente liberada para os animais, via fluxômetro, diretamente dentro do ramo inspiratório do circuito do aparelho de ventilação mecânica, distalmente ao umidificador do aparelho, a 30 cm do tudo traqueal. As concentrações de NOi e de dióxido de nitrogênio (NO₂) foram medidas por meio de sensor eletroquímico (*J P Moryia Ind & Com Ltda., São Paulo, Brasil*) a partir de amostras de gás obtidas o mais próximo possível do tudo endotraqueal. O alarme audiovisual foi mantido em uma dose de 1 ppm acima da dose de NOi ditada pelo protocolo e a um nível máximo de NO₂ de 3 ppm. O sensor eletroquímico era calibrado diariamente.

2.4 Formação dos Grupos Experimentais

Os animais compuseram três grupos experimentais para instrumentação e outro grupo utilizado apenas para análise da capacidade antioxidante total. Cada um dos grupos contou com 10 animais:

- Animais sem lesão instrumentados e submetidos à VM (controle – GC);
- Animais com LPA submetidos à VM protetora (GVM);
- Animais com LPA submetidos à VM protetora associada ao NOi (GVM-NO);
- Animais sadios (GSadio), sem lesão e sem ventilação, estudados para análise da capacidade antioxidante total.

Os coelhos do GC foram ventilados conforme descrito anteriormente, enquanto que nos animais do GVM e do GVM-NO (portadores de LPA), a PEEP foi gradualmente aumentada até 8 - 9 cmH₂O na primeira hora, para minimizar a hipotensão sistêmica, e, então, até 10 cmH₂O nas três horas seguintes. A FiO₂ foi mantida em 1,0 para todos os animais, durante as quatro horas do experimento.

Gasometrias foram realizadas no tempo zero, após a lesão (nos grupos experimentais) e a cada 30 minutos até completar quatro horas de experimentação, sendo utilizados para as análises os seguintes momentos: antes da lesão; depois da lesão; 30; 60; 120; 180 e 240 minutos.

2.5 Manipulação dos Pulmões e Histologia Pulmonar

Os animais foram sacrificados por meio de administração intravenosa rápida de cetamina. Após o sacrifício, o tubo traqueal foi ocluído e o tórax aberto para excluir a presença de pneumotórax oculto, confirmar a posição dos cateteres vasculares e do tubo traqueal e coletar amostra para análise histológica e para lavado broncoalveolar (BAL). Nos animais nos quais foi realizado o BAL (n=5 para cada grupo), o brônquio fonte direito foi ligado por meio de uma fita cirúrgica, o bloco pulmão/coração removido e o pulmão esquerdo lavado duas vezes utilizando-se alíquota de 15 mL/Kg de salina. O fluido drenado foi coletado para análise do BAL. Em outros cinco animais, o pulmão direito foi dissecado e estocado à - 80°C para a análise do estresse oxidativo. Nos animais submetidos à análise histológica, o bloco traquéia/pulmão/coração foi removido, os pulmões e a traquéia separados do coração e o pulmão esquerdo preenchido com solução de formol a 10%. O preenchimento foi realizado por meio de uma coluna de equipo de soro de 30 cm de comprimento conectada em uma de suas extremidades a um frasco que continha formol, e na outra à traquéia do animal. A partir desse sistema, o formol gotejava por gravidade, lentamente, de forma a preencher os espaços alveolares, preservando a arquitetura alveolar. Após período mínimo de fixação de 24 horas, fragmentos foram embebidos em parafina e foram realizados cortes axiais de pulmão que foram

corados com hematoxilina e eosina e examinados por dois patologistas, de forma cega e independente. Para o estudo histológico os cortes foram examinados sob microscopia óptica, utilizando-se aumento de 200x, com auxílio de uma grade de área conhecida em uma das oculares composta por 100 pontos e 50 retas. Em cada lâmina, o espécime foi dividido em duas zonas distintas, representando as regiões dependentes (dorsais) e não-dependentes (ventrais) do pulmão. Dez campos microscópicos foram aleatoriamente selecionados para o exame, sendo cinco em cada região, totalizando 50 análises para cada animal. O dano histopatológico pulmonar foi quantificado por um escore que analisa sete variáveis (inflamação alveolar, inflamação intersticial, hemorragia alveolar, hemorragia intersticial, edema, atelectasia e necrose) com cinco graus individuais de gravidade para cada uma delas^{48,49}, a saber: sem lesão = 0; lesão até 25% do campo = 1 ponto; lesão até 50% do campo = 2 pontos; lesão até 75% do campo = 3 pontos; lesão difusa = 4 pontos. O máximo valor escore possível foi de 28 e o mínimo de zero.

2.6 Curvas pressão-volume

Curvas estáticas de pressão-volume do sistema respiratório foram obtidas ao final do período de quatro horas de experimento, a partir do ventilador *Galileo Gold*.

2.7 Contagem de células polimorfonucleares no fluido de lavagem pulmonar

As células totais do BAL foram contadas por meio de câmara de Neubauer. O volume foi medido e centrifugado. As células obtidas por centrifugação foram ressuspensas em 1 mL de salina e depois diluídas 1:10 em solução de Turk para contagem. A contagem diferencial foi realizada em esfregaço da mesma amostra de células, em lâminas e coloração de Leishman. A fixação das células em lâminas foi realizada por meio de citocentrifugação.

2.8 Medida da concentração de TNF-alfa no fluido de líquido de lavagem pulmonar

A dosagem de TNF-alfa do BAL foi realizada utilizando o método de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), conforme Imai et al.⁴⁵ e protocolo fornecido pelo fabricante (*PharMingen*®). O método de ELISA utilizou um anticorpo policlonal de cabra anti-TNF-alfa como anticorpo de captura na concentração de 4 µg/mL e um anticorpo de cabra policlonal anti TNF-alfa biotinizado como anticorpo de revelação.

2.9 Determinação do Estresse Oxidativo Pulmonar

O estresse oxidativo do tecido pulmonar foi avaliado pelo método da Capacidade Antioxidante Total (TAP) descrito por Aldini et al.⁵⁰. Resumidamente, o método TAP, determinando o estresse antioxidante/oxidante total, é o único que pode capturar a rede antioxidante dos compartimentos lipofílico e hidrofílico e suas interações⁵¹. O método foi validado por Beretta et al.⁵² e aplicado a tecidos, excluindo-se o tecido pulmonar⁵³. É baseado na geração de um radical lipofílico (MeO-AMVN) e um substrato lipofílico oxidável (BODIPY) que, especificamente, mede a oxidabilidade do compartimento lipídico relacionado a ação de antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis, por meio de mecanismo de sinergismo e cooperação⁵⁴.

O TAP do pulmão foi quantificado pela comparação da área sob a curva relativa à cinética de oxidação da suspensão do lipossomo da fosfatidilcolina, utilizado como matriz biológica de referência. A capacidade antioxidante varia de 0% (sem proteção) a 100% (proteção total)⁵⁴. Os lipossomas para controle foram preparados conforme validação prévia de Ferreira et al. (2007) em tecido animal⁵⁵. Um fragmento da porção dorsal do pulmão direito foi pesado (0,4g), macerado e homogeneizado por 20s sob gelo com 2 mL de tampão fosfato (100mM, pH7,4) utilizando IKA - *Ultra-Turrax T8 homogenizer* (Wilmington, NC). Alíquotas de sobrenadante foram coletadas após centrifugação [800 g por 15 min em centrífuga refrigerada do tipo Sorvall RT 6000 (Du Pont Co., Newtown, CT)] do homogenado

de tecido pulmonar e utilizadas para o TAP. A concentração protéica foi determinada utilizando o *BAC Protein Assay*, como previamente descrito^{48,54}. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.10 *Determinação dos níveis plasmáticos dos subprodutos do NO*

Para determinar a concentração plasmática dos subprodutos do óxido nítrico (NOx) foi utilizada medida combinada de nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), como descrito previamente^{56,57} por meio do quite Nitrate/Nitrite Fluorometric (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). O limite de detecção para o método foi de 0.2 µM.

2.11 *Variáveis Analisadas*

Resumidamente, as variáveis analisadas foram:

- a) Variáveis hemodinâmicas: frequência cardíaca e pressão arterial média;
- b) Gasometria arterial: pH, PaO₂, PaCO₂, HCO₃, BE e SaO₂;
- c) Parâmetros ventilatórios: pressão inspiratória; pressão expiratória final positiva, fluxo, fração inspirada de oxigênio, volume corrente, tempo inspiratório, frequência respiratória e pressão média das vias aéreas;
- d) Mecânica pulmonar: complacência pulmonar e curva pressão-volume estática.
- e) Índices derivados para avaliar trocas gasosas: relação PaO₂/FiO₂, índice de oxigenação (FiO₂ x pressão média vias aéreas x 100/PaO₂); índice de eficiência ventilatória (IEV=3800/[(Pip-Peep)xPaCO₂xFRmecânica]).
- g) Processo inflamatório alveolar: contagem de polimorfonucleares e dosagem do TNF-alfa no fluido do lavado broncoalveolar.
- h) Histologia: descrito no item Manipulação dos pulmões e Histologia Pulmonar;
- i) Capacidade antioxidante total do tecido pulmonar.
- j) Subprodutos do óxido nítrico.

2.12 Análise Estatística

Variáveis com distribuição normal foram comparadas entre os diversos grupos experimentais por meio de análise de variância (ANOVA), com subseqüentes comparações múltiplas entre pares por meio do teste de Bonferroni e foram expressos como média e desvio padrão (média±sd). Variáveis de distribuição não-normal foram comparadas entre os diversos grupos por meio de ANOVA de Kruskal-Wallis, com subseqüentes comparações pelo teste de Dunn e os resultados apresentados como mediana (variação). A análise do comportamento de uma variável ao longo do tempo, em caso de distribuição normal, foi efetuada por meio de ANOVA de medidas repetidas, com comparação entre pares com o teste de Bonferroni e em caso de distribuição não normal foi utilizado o teste de medidas repetidas de Friedman, com comparações posteriores pelo método de Dunn. O teste *t* foi utilizado para comparar o número de lavagens pulmonares entre os dois grupos tratados e o Qui quadrado foi utilizado para comparar as proporções do líquido recuperado da lavagem pulmonar. Foi utilizado nível de significância de 5%.

3. Resultados

Não houve diferença estatística entre os pesos dos animais dos três grupos estudados (GC: 2,66±0,24 Kg = GVM: 2,6±0,25 Kg = GVM-NO: 2,57±0,25 Kg – $p>0,05$). Igualmente, não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao número de lavagens pulmonares necessárias para induzir LPA nos grupos com e sem óxido nítrico (GVM: 9,5±3,69 = GVM-NO: 7,3±2,75; $p>0,05$), sendo semelhante a porcentagem de líquido recuperado dos pulmões dos animais destes dois grupos (GVM: 85% = GVM-NO: 83,2%; $p>0,05$).

Quanto à mortalidade dos animais, no GVM foram executados 13 experimentos, sendo três perdidos por óbito (pneumotórax, sangramento traqueal e término do torpedo de oxigênio do aparelho de gasometria durante o experimento). No GVM-NO, foram utilizados 12 animais, sendo dois eliminados por óbito

(sangramento na dissecação arterial e hipóxia refratária). No GC houve um óbito por hipotensão refratária.

Comparando os momentos e grupos antes e depois da indução da LPA, a tabela 1 mostra importante deterioração da função dos pulmões. Houve diminuição significativa dos valores da relação PaO_2/FiO_2 , aumento do índice de oxigenação, diminuição da complacência pulmonar estática, aumento da pressão aérea média e aumento da $PaCO_2$. Além disso, observou-se o desenvolvimento de acidemia metabólica depois da lavagem pulmonar.

Tabela 1 - Médias e desvios padrão dos valores da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, índice de oxigenação, complacência pulmonar estática, pressão aérea média, PaCO_2 e pH antes e depois da realização das lavagens pulmonares para instalação do modelo experimental para o grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica sem óxido nítrico (GVM) e grupo ventilação mecânica com óxido nítrico (GVM-NO).

	GVM (n=10)		GVM-NO (n=10)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
Relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	475±77 aB	80 ±13 AA	446±74 aB	81±24 aA
Índice de oxigenação (cm $\text{H}_2\text{O}/\text{mm Hg}$)	1,8±0,7 aA	12±2,0 aB	1,7±0,4 aA	14±5,2 aB
Complacência pulmonar estática (mL/cmH_2O)	3,3±0,2 aB	1,4±0,3 AA	3,2±0,5 aB	1,3±0,2 aA
Pressão aérea média (mmHg)	8,2±1,8 aA	10±1,5 aB	7,5±0,6 aA	10±0,9 aB
PaCO_2 (mmHg)	40±4,8 aA	50±6,0 aB	40±6,0 aA	47±6,0 aB
pH	7,3±0,06 aB	7,2±0,06 aA	7,3±0,07 aB	7,2±0,05 aA

n=número de animais; Índice de oxigenação = $[(\text{FiO}_2 \times \text{pressão aérea média})/\text{PaO}_2] \times 100$.

Letras maiúsculas comparam os momentos antes e depois dentro de cada grupo; letras minúsculas comparam os grupos em cada momento e letras diferentes indicam diferenças significantes, com $p < 0,05$. Teste Estatístico: ANOVA de medidas repetidas com comparação entre pares pelo teste de Bonferroni.

3.1 Hemodinâmica, mecânica pulmonar e trocas gasosas

Conforme ditava o protocolo, os animais foram submetidos à ventilação mecânica protetora, sendo garantido volume corrente fixo de 6 mL/Kg no modo pressão regulada/volume controlado. Da mesma forma a pressão expiratória final positiva foi mantida em 5 cmH₂O nos animais controle e progressivamente aumentada nos animais com LPA. Assim, para o GC não houve diferença entre os valores da PEEP nos momentos de avaliação, sendo a PEEP de 5 cmH₂O aplicada ao longo de todo o experimento. Para os animais com LPA, com e sem NO_i, a PEEP foi progressivamente aumentada, sem diferença significativa entre GVM e GVM-NO a partir de 30 minutos. Os valores da PEEP foram significativamente maiores nos grupos submetidos a lesão pulmonar que no GC (tabela 2).

Tabela 2 - Médias e desvios padrão dos valores da pressão expiratória final positiva (PEEP) ao longo do experimento para o grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica sem óxido nítrico (GVM) e grupo ventilação mecânica com óxido nítrico (GVM-NO).

Valores da PEEP (cmH₂O) nos diferentes momentos de avaliação					
Grupos	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min
GC	5,0±0,0aA	5,0±0,0aA	5,0±0,0aA	5,0±0,0aA	5,0±0,0aA
GVM	6,7±0,47bA	8,0±0,32bB	9,5±0,58bC	9,8±0,42bC	9,8±0,42bC
GVM-NO	6,6±0,94bA	8,2±1,09bB	9,5±0,53bC	9,7±0,68bC	9,3±0,82bC

Letras maiúsculas comparam os momentos dentro de cada grupo; letras minúsculas comparam os grupos em cada momento; letras diferentes indicam diferenças significantes, com $p < 0,05$.

Testes Estatísticos: Análise de variância (ANOVA) com comparação entre pares pelo método de Bonferroni, para comparar grupos e ANOVA de Medidas repetidas, para comparar momentos.

Na avaliação do estado hemodinâmico dos animais, observou-se que a PAM não foi estatisticamente diferente entre os momentos ao longo do experimento (figura 1), indicando a estabilidade da preparação por meio do controle rigoroso da variável e administração de drogas vasoativas, mantendo a PAM acima de 50 mmHg (Figura 1) nos três grupos experimentais. Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores do escore inotrópico para os três grupos estudados [GC: 50 (0-70)=GVM: 50 (0-70) = GVM-NO: 50 (0-70); $p>0,05$].

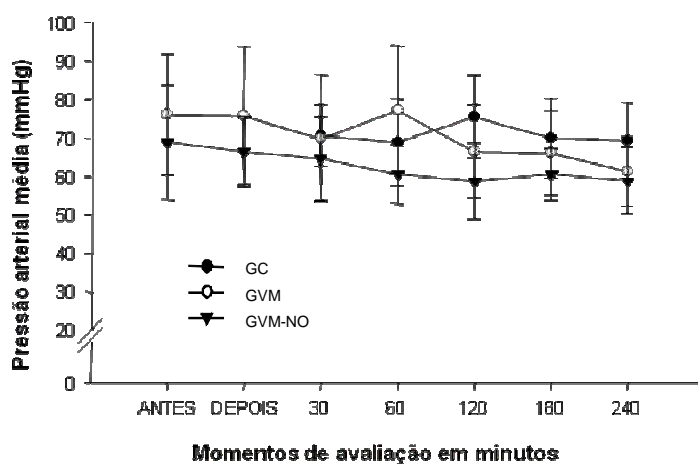


Figura 1 – Evolução da pressão arterial média antes e depois da lavagem pulmonar e ao longo de quatro horas de experimentação para o grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica sem óxido nítrico (GVM) e grupo ventilação mecânica com óxido nítrico (GVM-NO). $p>0,05$ entre os momentos e grupos. ANOVA e ANOVA de medidas repetidas.

No que se refere à função pulmonar, a relação pressão-volume estática do sistema respiratório para os grupos experimentais está ilustrada na figura 2. Como esperado, os grupos nos quais a lesão foi induzida exibiram piora importante (desvio para direita) da complacência estática dos pulmões depois da indução da lesão pulmonar, comparado aos animais do GC.

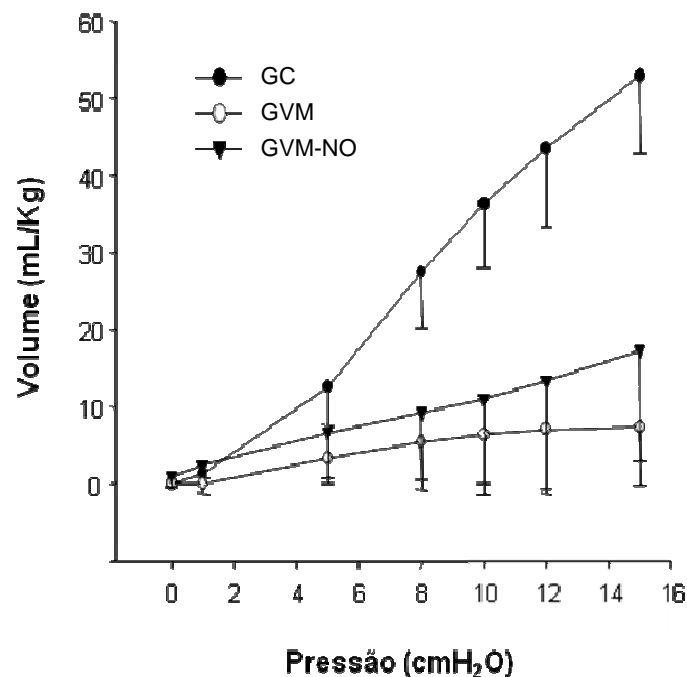


Figura 2 - Relação entre volume e pressão estática total do sistema respiratório para os animais do grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica sem óxido nítrico (GVM) e grupo ventilação mecânica com óxido nítrico (GVM-NO) obtidas no final do experimento. Observa-se desvio para a direita da curva nos grupos com lesão pulmonar quando se compara com o controle, indicando piora da complacência pulmonar nestes animais.

Observando-se, mais detalhadamente, o comportamento da complacência pulmonar ao longo das quatro horas de ventilação, verificou-se que a diminuição da complacência pulmonar estática que ocorreu nos animais depois da indução da lesão pulmonar persistiu ao longo do experimento, sem diferença estatística entre GVM e GVM-NO, sendo seu valor significativamente menor em ambos os grupos, quando comparado ao GC. A diminuição da complacência pulmonar que ocorreu no GC ao longo do experimento deveu-se, provavelmente, ao efeito da ventilação mecânica *per se*, ainda assim esta queda foi significativamente menos importante do que a que ocorreu nos animais tratados (figura 3).

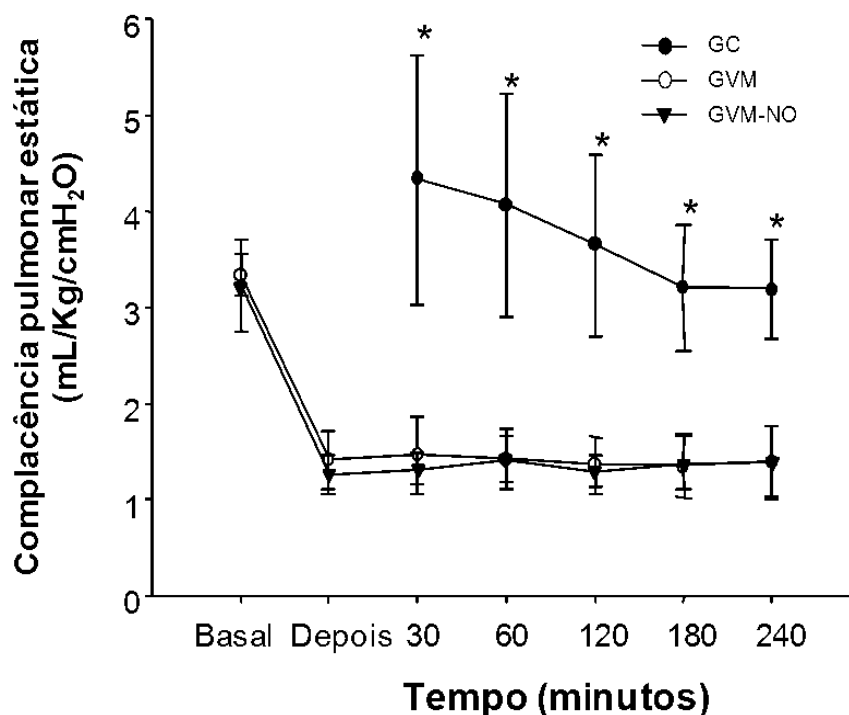


Figura 3 - Evolução da complacência estática do sistema respiratório antes e depois da lavagem pulmonar e ao longo de quatro horas de experimentação para o grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica sem óxido nítrico (GVM) e grupo ventilação mecânica com óxido nítrico (GVM-NO). * $p < 0,05$ comparando grupos sem e com óxido nítrico com o grupo controle - ANOVA (Bonferroni).

O comportamento apresentado pela complacência pulmonar pode ser melhor entendido quando se analisa a evolução dos valores da pressão inspiratória (PIP) e da pressão aérea média (MAP) ao longo do experimento. Tanto a PIP quanto a MAP aumentaram nos grupos tratados e foram significativamente superiores aos valores dos animais do GC. Como o VC era fixo, o aumento da PIP e da MAP evidencia deterioração da mecânica respiratória (figura 4).

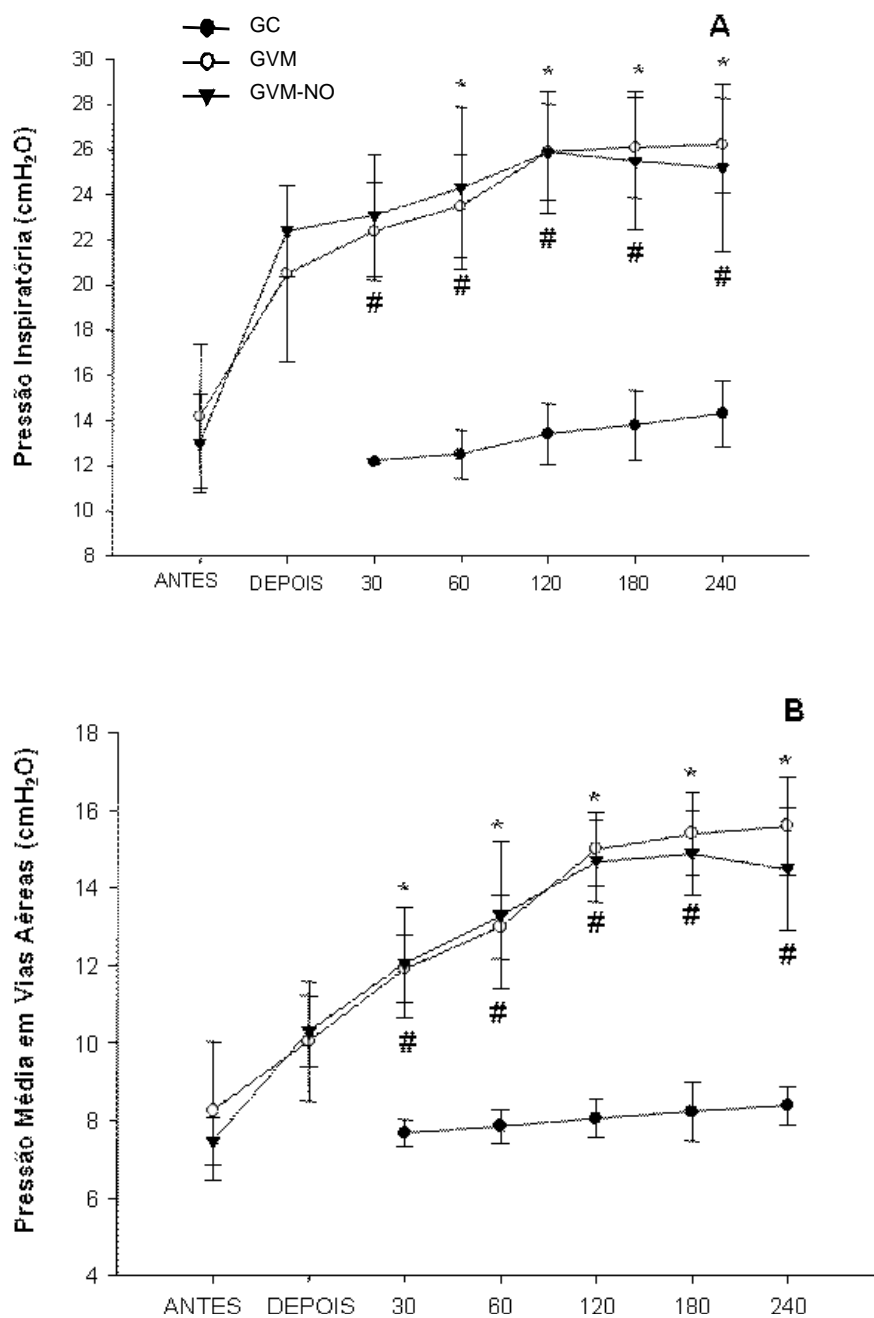


Figura 4 - Evolução da pressão inspiratória (painel A) e da pressão média em vias aéreas (painel B) antes e depois da lavagem pulmonar e ao longo de quatro horas de experimentação para o grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica sem óxido nítrico (GVM) e grupo ventilação mecânica com óxido nítrico (GVM-NO). *: $p < 0,05$ comparando GVM e GC; #: $p < 0,05$ comparando GVM-NO com GC. Análise de variância (ANOVA) com comparação entre pares pelo método de Bonferroni.

Quanto aos índices de oxigenação, observou-se importante deterioração da oxigenação dos animais submetidos ao protocolo de lavagem pulmonar, quadro este traduzido por diminuição dos valores da PaO_2/FiO_2 e aumento do índice de oxigenação (IO) dos animais do GVM e do GVM-NO quando comparados com o GC (figura 5). A aplicação da ventilação mecânica, com aumento progressivo da PEEP, melhorou a oxigenação no GVM e no GVM-NO, sem que os animais tratados atingissem os valores de PaO_2/FiO_2 do GC e sem diferença estatística significativa entre eles.

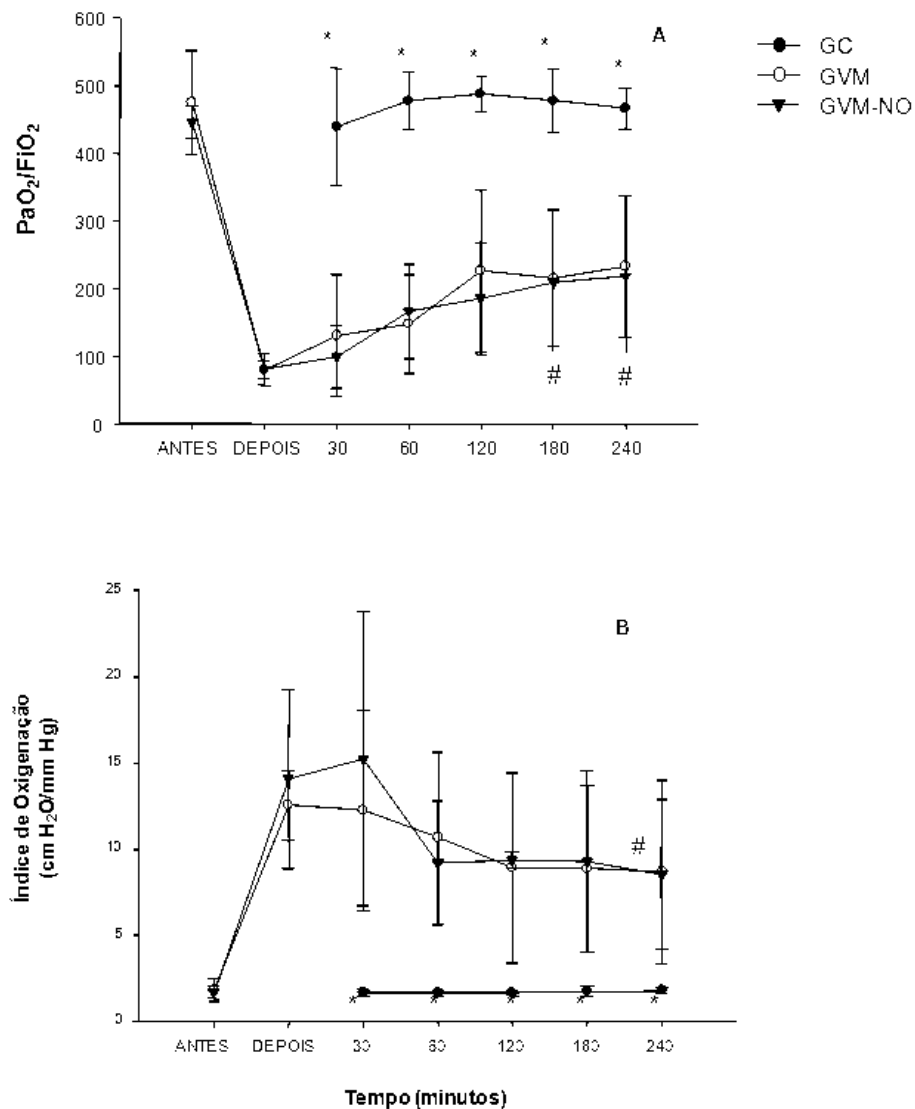


Figura 5 - Evolução da relação entre a pressão arterial de oxigênio e a fração inspirada de oxigênio ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$; painel A) e do índice de oxigenação (painel B) antes e depois da lavagem pulmonar e ao longo de quatro horas de experimentação para o grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica sem óxido nítrico (GVM) e grupo ventilação mecânica com óxido nítrico (GVM-NO). $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$: *: $p < 0,05$ comparando GC com grupos tratados; #: $p < 0,05$ comparando GVM e GVM-NO em 180 e 240 minutos com 30 minutos.

Índice de Oxigenação: *: $p < 0,05$ comparando GC com grupos tratados; #: $p < 0,05$ comparando 240 com 30 minutos para o grupo GVM-NO.

Testes Estatísticos: Análise de variância (ANOVA) com comparação entre pares pelo método de Bonferroni, para comparar grupos e ANOVA de Medidas repetidas, para comparar momentos.

Quanto à ventilação, os resultados demonstraram que a PaCO_2 foi significativamente maior no GVM comparado com o GC ao longo de todo o experimento. O GVM-NO apresentou níveis de PaCO_2 iguais ao GC e GVM em vários momentos, sendo estatisticamente diferente do GC apenas no momento 240 minutos. Por outro lado, avaliando-se a ventilação pelo índice de eficiência ventilatória ($\text{IEV} = 3800 / [(\text{Pip} - \text{Peep}) \times \text{PaCO}_2 \times \text{FR}_{\text{mecânica}}]$), forma que leva em conta não apenas a PaCO_2 mas também a frequência respiratória mecânica e o VC, observou-se que, já a partir de 30 minutos, os animais do GVM e GVM-NO apresentaram valores significativamente mais baixos que os animais do GC e que não houve melhora do índice ao longo do experimento para os dois grupos de animais tratados (figura 6).

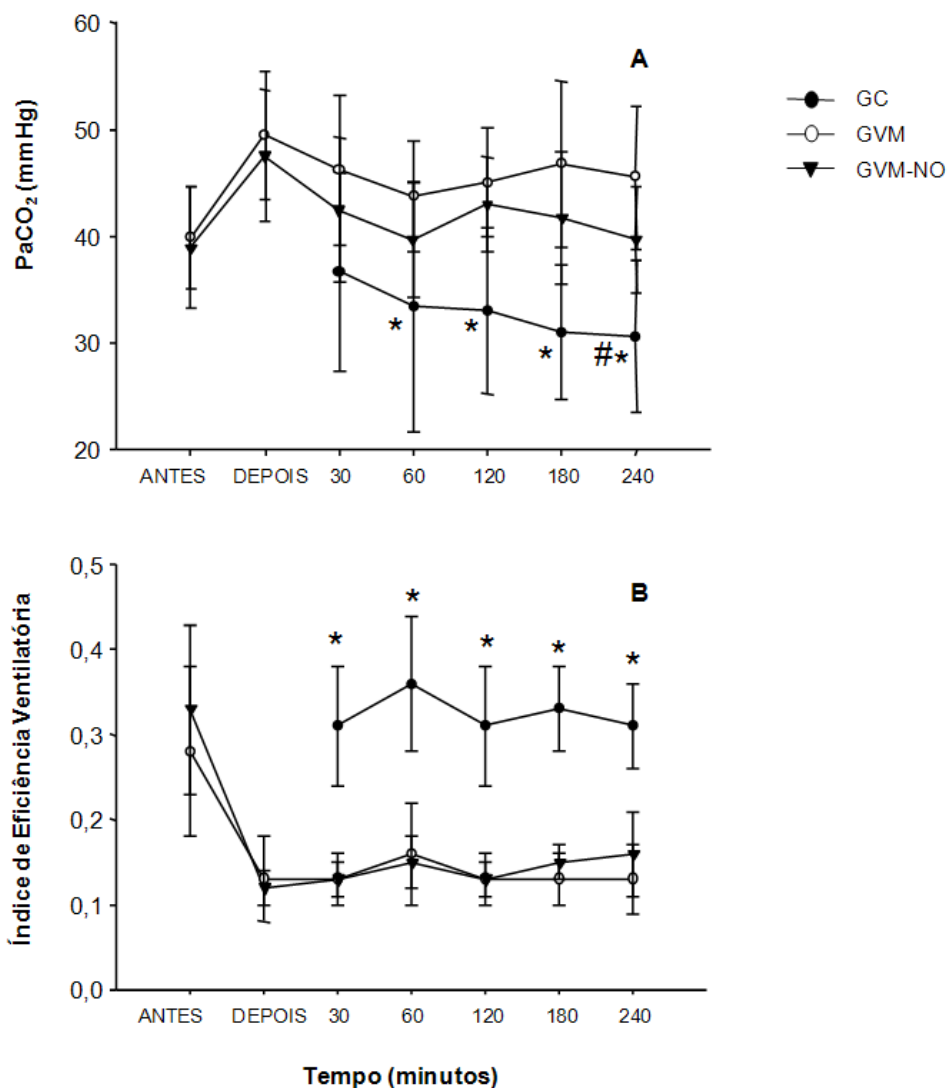


Figura 6 - Evolução da pressão arterial parcial de gás carbônico (PaCO₂; painel A) e do índice de eficiência ventilatória (painel B) antes e depois da lavagem pulmonar e ao longo de quatro horas de experimentação para o grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica sem óxido nítrico (GVM) e grupo ventilação mecânica com óxido nítrico (GVM-NO).

PaCO₂: *: p<0,05 comparando GC com GVM; #: p<0,05 comparando GC com GVM-NO no momento 240 minutos.

Índice de eficiência ventilatória: *: p<0,05 comparando GC com GVM e GVM-NO para todos os momentos.

Testes Estatísticos: Análise de variância (ANOVA) com comparação entre pares pelo método de Bonferroni, para comparar grupos e ANOVA de Medidas repetidas, para comparar momentos.

Analisando-se os valores do pH sanguíneo, observou-se que o GVM e o GVM-NO apresentaram níveis significativamente mais baixos que o GC ao longo do experimento, sem diferença significativa entre os grupos tratados. Quanto aos valores de bicarbonato, não houve diferença entre os grupos em nenhum momento. No entanto, os valores de bicarbonato ao final do experimento foram significativamente mais baixos quando comparados ao momento 30 minutos para os três grupos (figura 7). Entende-se esta queda em todos os grupos como decorrência da geração de ácidos pela manutenção do animal por período de quatro horas de VM.

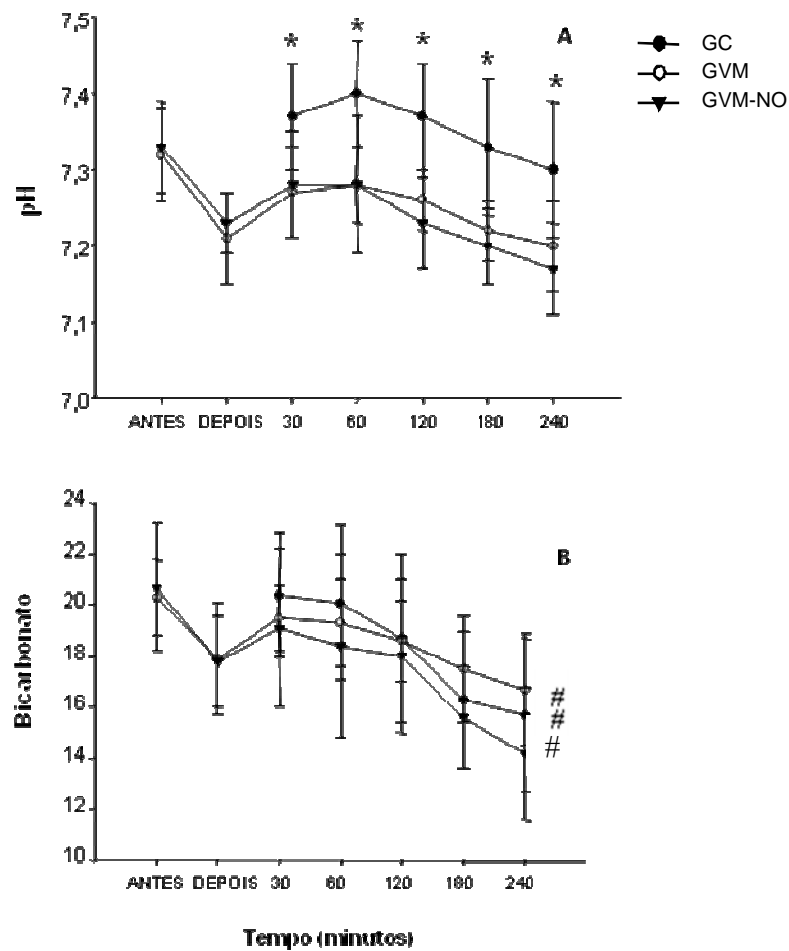


Figura 7 - Evolução do pH (painel A) e do bicarbonato sanguíneos (painel B) antes e depois da lavagem pulmonar e ao longo de quatro horas de experimentação para o grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica sem óxido nítrico (GVM) e grupo ventilação mecânica com óxido nítrico (GVM-NO). **pH:** *: $p < 0,05$ comparando GC com GVM e GVM-NO.

Bicarbonato: $p > 0,05$ entre grupos em todos os momentos; #: $p < 0,05$ comparando 240 minutos com 30 minutos para todos os grupos.

Testes Estatísticos: Análise de variância (ANOVA) com comparação entre pares pelo método de Bonferroni, para comparar grupos e ANOVA de Medidas repetidas, para comparar momentos.

3.2 Inflamação: Contagem de células no lavado broncoalveolar

O número de células PMN recuperadas do BAL foi significativamente maior no GVM que no GC e no GVM-NO (GVM: $4,80 \pm 1,64$ > GC: $0,16 \pm 0,15$ = GVM-NO: $0,96 \pm 0,35$ número de PMN x 10^6 ; $p < 0,05$), conforme apresentado na figura 8.

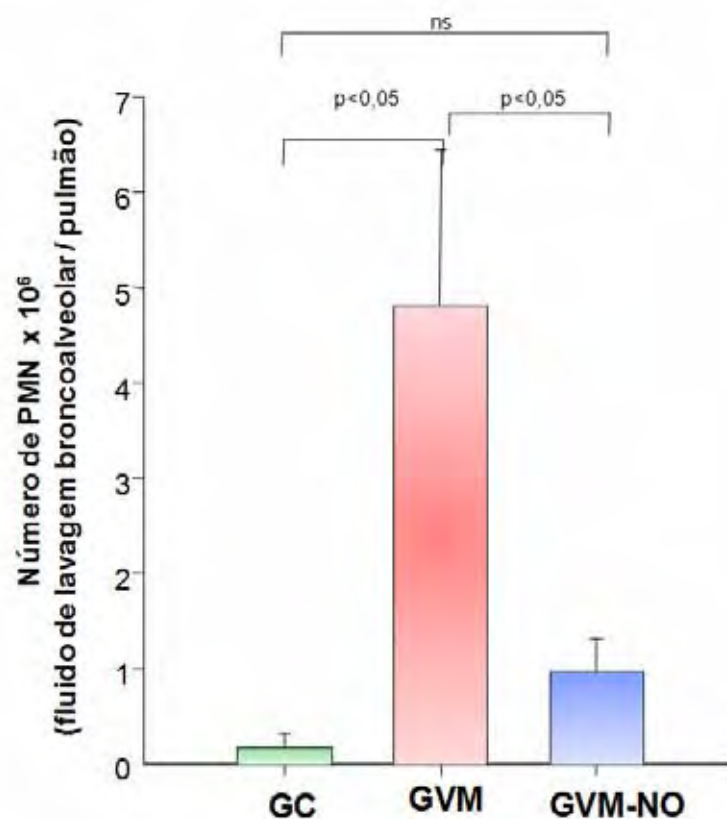


Figura 8 – Número de polimorfonucleares no fluido de lavado pulmonar ao final do experimento para o grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica sem óxido nítrico (GVM) e grupo ventilação mecânica com óxido nítrico (GVM-NO). ANOVA de Kruskal-Wallis, com subseqüentes comparações pelo teste de Dunn. ns: não significativo.

3.3 Lesão histopatológica

A análise dos cortes histológicos evidenciou que os animais do GC apresentaram arquitetura pulmonar normal, em contraste com as amostras do GVM e GVM-NO, as quais apresentaram infiltrado inflamatório denso, edema alveolar proteináceo, hemorragia alveolar e intersticial e atelectasia, com destaque para o infiltrado inflamatório composto por polimorfonucleares. A avaliação do escore de lesão histológica mostrou diferença estatística significativa na comparação dos grupos tratados, sendo maior nestes que no controle [(GVM: 5 (1-16)>GVM-NO:2 (0-5)>GC: 0 (0-3); $p<0,05$)], como apresentado na figura 9.

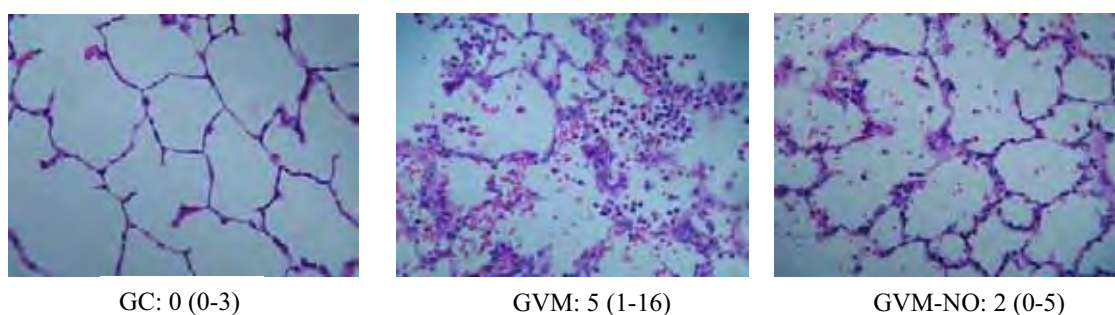


Figura 9 - Fotomicrografias digitais de microscopia óptica (200x, hematoxilina e eosina) representativas de amostras de pulmão de animais do grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica sem óxido nítrico (GVM) e grupo ventilação mecânica com óxido nítrico (GVM-NO), de áreas dependentes dos pulmões. $GVM > GVM-NO > GC$; $p<0,05$: ANOVA de Kruskal-Wallis, com subseqüentes comparações pelo teste de Dunn.

3.4 Fator de Necrose Tumoral-alfa

Os níveis do TNF-alfa no BAL foram significativamente maiores nos grupos com lesão pulmonar [GVM ($316,50 \pm 313,70 \mu\text{g/mL}$) = GVM-NO ($162,5 \pm 83,6 \mu\text{g/mL}$)] comparado com o GC ($32,9 \pm 9,0 \mu\text{g/mL}$), ou seja, $GVM = GVM-NO > GC$; $p<0,05$.

3.5 Estresse Oxidativo

O TAP do tecido pulmonar do GVM-NO foi significativamente mais elevado (maior proteção) que do GVM, sendo que nos grupos com LPA os valores foram menores que no GSadio e GC (GSadio:68±8,7=GC:66,4±6,8>GVM-NO:56,3±5,1>GVM:45,9±3,4 % proteção/g proteína; p<0,05) (Figura 10).

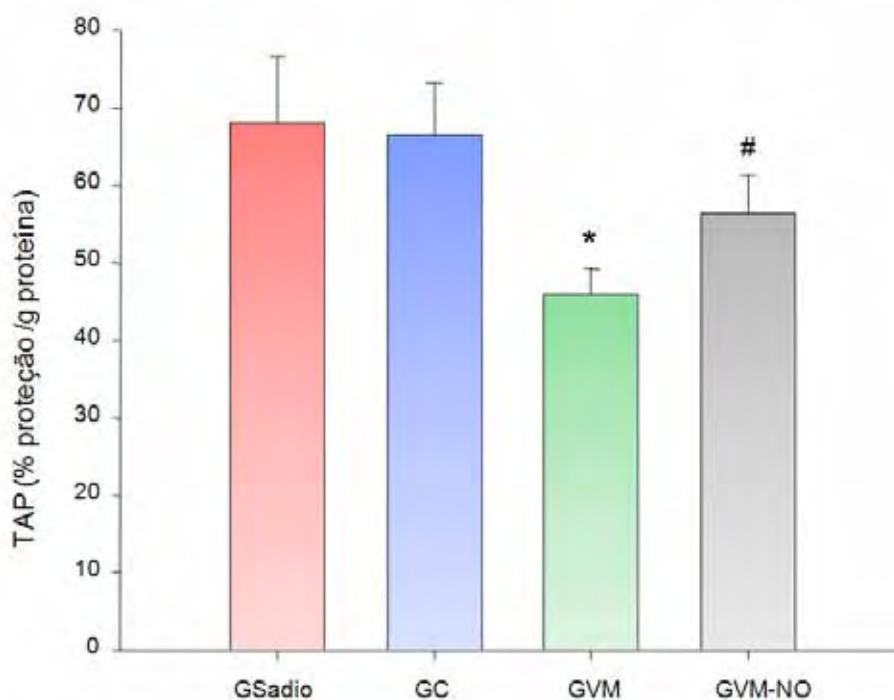


Figura 10 – Porcentagem de proteção pulmonar avaliada pela Capacidade Antioxidante Total (TAP) para o grupo sadio (GSadio), grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica convencional sem óxido nítrico (GVM) e grupo ventilação mecânica convencional com óxido nítrico (GVM-NO). *: p<0,05 comparando GVM com GVM-NO, GSadio e GC. #: p<0,05 comparando GVM-NO com GSadio e GC.

Não houve diferença estatisticamente significante nas concentrações dos subprodutos do NO entre os grupos (NOx - GSadio: 5,87±2,4=GC: 3,54±1,1=GVM: 4,45±2,1=GVM-NO: 7,3±2,6 μmol/L; p>0,05).

4. Discussão

Enquanto vários estudos avaliaram os efeitos da VM protetora sobre oxigenação, inflamação e lesão histopatológica pulmonar em modelos experimentais de LPA, poucos avaliaram o estresse oxidativo^{58,59}. Até onde pudemos constatar, não existem estudos que tenham avaliado os efeitos do NOi, associado à VM protetora, sobre o estresse oxidativo determinado pelo método TPA em tecido pulmonar.

4.1 Escolha da espécie animal

Como há mais de uma alternativa de modelo animal para estudar LPA, na escolha do animal a ser utilizado é preciso levar em consideração aspectos práticos tais como facilidade de obtenção, grau de dificuldade técnica na manipulação, experiência descrita na literatura e custo. Estudamos as características do coelho em literatura especializada^{44,58,60} e por estas razões o coelho foi escolhido.

4.2 Manipulação dos animais

Para que a equipe dominasse as técnicas de dissecação dos vasos sanguíneos, traqueotomia, lavagem pulmonar e ventilação mecânica em coelhos foram realizados vários experimentos-piloto, ocupando sete animais e cerca de seis meses. A realização rápida destes procedimentos é decisiva para o sucesso do experimento, pois se houver demora, sangramento ou hipóxia os animais podem apresentar instabilidade hemodinâmica irreversível. A propósito, a instabilidade hemodinâmica é característica deste modelo em coelhos e por esta razão a administração de drogas vasoativas e inotrópicas para manter a pressão arterial sistêmica dentro do limite estabelecido pelo protocolo é regra, como relatado por outros autores^{44,58}. Outro fator a ser controlado rigorosamente é a temperatura corporal, pois a hipotermia também determina deterioração dos animais do ponto de vista metabólico e cardiovascular. A monitoração contínua da temperatura retal e a

utilização de bolsas térmicas foram importantes para garantir a estabilidade dos nossos animais.

Tem sido descrito que a mortalidade de coelhos submetidos a este tipo de procedimento é de aproximadamente 10%⁶¹, em acordo com nossos achados.

4.3 Características gerais dos grupos

Os animais dos três grupos não diferiram quanto ao peso, variáveis de oxigenação, ventilação, metabólicas e hemodinâmicas antes de serem submetidos à indução da lesão pulmonar. Tal fato é importante para garantir que os grupos pudessem ser comparados.

4.4 Modelo de Lesão Pulmonar Aguda

Neste modelo, a lesão pulmonar manifesta-se por distúrbio da relação ventilação-perfusão (V/Q), tanto pelo efeito *shunt*, quanto pelo aumento do espaço morto. A mecânica ventilatória também se encontra prejudicada pelo comprometimento da complacência e aumento da resistência pulmonar. O aumento da permeabilidade capilar provoca edema alveolar, agravando ainda mais o processo⁶².

O modelo de lavagem pulmonar com salina aquecida foi desenvolvido por Lachmann et al., em 1980⁶³, baseado na observação de que a LPA associa-se à depleção de surfactante nos espaços alveolares e diminuição da concentração de proteínas associadas ao surfactante no lavado broncoalveolar⁶⁴. Neste modelo, solução isotônica de salina aquecida é infundida nos pulmões e imediatamente removida, em lavagens sucessivas. Os ciclos de lavagem reduzem a concentração do lípide surfactante na superfície alveolar alterando a tensão da superfície alveolar. A substância surfactante é uma complexa mistura de proteínas e fosfolípidos com várias funções fundamentais para os pulmões⁶⁴. O surfactante diminui a tensão superficial e previne o colapso alveolar, quando o volume pulmonar encontra-se

reduzido. As proteínas do surfactante estabilizam o próprio surfactante e modulam a resposta do hospedeiro no alvéolo⁶⁵. A lavagem com salina induz ao dano alveolar por dois mecanismos básicos: 1) aumento do colapso alveolar, magnificando a LPIVM e 2) comprometendo a resposta de defesa alveolar. Muitos estudos combinaram este modelo com VM, criando, muitas vezes, um fator de confusão quando se analisa qual elemento é responsável pela lesão alveolar, a lavagem ou a VM⁶⁶. A adoção da VM protetora em nosso estudo pode ter minimizado este viés associado ao fato de não ter havido consumo de antioxidantes nos animais do GC (figura 10).

Vários outros modelos foram descritos para a indução de LPA em coelhos⁶⁶, incluindo, entre outros: lesão hiperóxica; administração intratraqueal de ácido oléico; uso subcutâneo de N-nitroso-N-metiluretano (NNNMU); instilação traqueal de ácido clorídrico; injeção de polissacáride de *E. coli*. A lesão hiperóxica tem efeitos muito variáveis dependendo da concentração de oxigênio. Além disso, os animais precisam ser mantidos em ambiente fechado com altas concentrações de oxigênio por tempo prolongado, tornando o procedimento tecnicamente difícil. A injeção de ácido oléico produz edema e hemorragia pulmonar aguda e grave, sendo de reprodutibilidade difícil pela dificuldade de manutenção dos animais por tempo superior a duas horas. A utilização de NNNMU, por sua vez, exige preparação do laboratório experimental, pois sua inalação induz lesão pulmonar grave nos técnicos e pesquisadores; esta técnica vem sendo abandonada por estas dificuldades e pelo alto custo. A instilação de ácido clorídrico não foi utilizada pela escassez de estudos de sua aplicação em coelhos. Por outro lado, a injeção de *E. coli* vem sendo muito utilizada. No entanto, tem custo muito mais elevado comparando-se com a solução salina aquecida. Assim, a lavagem pulmonar com salina aquecida foi o modelo por nós escolhido pela larga experiência da literatura com a técnica, facilidade de reprodução e na manipulação dos animais, segurança dos pesquisadores, baixo custo e contato com pesquisadores que já utilizaram esta técnica.

Cabe a ressalva, no entanto, de que nenhum modelo animal é capaz de reproduzir todas as características da SDRA/LPA em humanos^{66,67}. Modelos de LPA em coelhos, por exemplo, associam-se com o dobro da produção de NO comparado a SDRA em humanos⁶⁶. O modelo de lavagem pulmonar causa lesão pulmonar muito parecida com a SDRA em humanos no que se refere aos seus efeitos sobre a oxigenação, complacência pulmonar, formação de atelectasia e edema perivascular e peribrônquico. Entretanto, induz a menor infiltração macrofágica e neutrofílica, a menos que outra agressão seja adicionada, por exemplo, a ventilação mecânica^{66,67}. Em adição, a remoção do surfactante interfere com a resposta imune e com o metabolismo oxidativo, uma vez que o surfactante pode inibir a ativação de neutrófilos respiratórios e tem efeito antioxidante sobre os macrófagos alveolares⁶⁸.

A característica deste modelo é promover hipoxemia quase imediata com aumento do *shunt* intrapulmonar e conseqüente diminuição da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, como observado em nosso experimento, lembrando que a FiO_2 foi mantida em 1,0 em todos animais, de forma a tornar a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ igual a PaO_2 . O índice de oxigenação ($\text{IO} = \text{FiO}_2 \times \text{pressão média vias aéreas} \times 100/\text{PaO}_2$), indicador da oxigenação e da agressividade da ventilação mecânica, aumentou e permaneceu elevado tanto por diminuição da oxigenação quanto por aumento da pressão média das vias aéreas. No presente estudo, a hipoxemia verificada após a indução da lesão foi de igual magnitude nos animais de ambos os grupos tratados, sem diferença significativa entre o número de lavagens. A propósito, o número de lavagens necessárias para se chegar a instalação do modelo em nossos animais foi comparável ao de outros estudos^{45,46,58}. Estes achados garantem a comparação dos animais dos grupos com lesão entre si e com o controle.

Para definir que a lesão pulmonar tinha efetivamente ocorrido, escolhemos o nível de relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$ mmHg, até mesmo para permitir correlação com a clínica, pois a SDRA é clinicamente definida por hipoxemia arterial refratária a administração de oxigênio com a relação nestes níveis¹. No entanto, na maioria dos

estudos observa-se que as lavagens pulmonares tornam os níveis da relação ainda mais baixos ($< 100 \text{ mmHg}$)^{44,58}, semelhantes aos que observamos para os dois grupos de estudo.

4.5 Resposta ao Óxido Nítrico Inalatório

O emprego do NOi já está bem estabelecido sob duas condições, ou seja, início precoce e adequado nível de abertura dos alvéolos⁶⁹⁻⁷¹. A responsividade ao gás pode ser significativamente influenciada pela aplicação de PEEP adequada. De acordo com recentes recomendações, a utilização do NOi em SDRA deve ser limitada a pacientes otimamente ventilados com níveis apropriados de pressão expiratória, uma vez que esta técnica permite a abertura de alvéolos adicionais para a troca gasosa^{71,72}. O aumento da PEEP melhora a oxigenação, sugerindo que as anormalidades nas trocas gasosas na SDRA refletem colapso alveolar, sem comprometimento da integridade da unidade de troca gasosa^{58,59}. Em nosso experimento, os animais submetidos à LPA apresentaram melhora da oxigenação, indicando resposta dos mesmos à aplicação da VM protetora, com aumento progressivo da PEEP. No entanto, os animais tratados não conseguiram atingir os valores de PaO_2 apresentados pelos animais do GC, até o final do experimento. Interessante foi a observação de que não houve diferença entre os grupos tratados quanto aos índices de oxigenação (IO e relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) nas quatro horas do experimento, indicando que o NOi não influenciou a oxigenação.

Esse achado pode ser explicado por vários fatores, pois a LPA/SDRA é uma síndrome complexa com inúmeras vias interligadas⁷³, como segue: 1) Tem sido descrito que a lavagem com salina aquecida é útil para indução da SDRA, porém, não existe modelo experimental capaz de reproduzir todas as alterações encontradas na SDRA de seres humanos, como descrito anteriormente⁷³. Assim é que a descrição de modelos respondedores e não respondedores ao gás já foi estudada por vários autores^{13,74}. Gust et al.⁷⁴ verificaram que a adição de baixas doses de endotoxina bacteriana ao modelo de SDRA provocado por ácido oléico transformou este

modelo de não respondedor em respondedor ao NOi; 2) diminuição da produção endógena de NO, pois estímulos provocados por citocinas, endotoxinas e hipóxia estimulariam a NO sintase contrapondo o reflexo vasoconstrictor hipóxico e diminuindo a ação do gás^{75,76}; 3) O efeito do NOi torna-se máximo a partir de quatro horas⁷¹, dificultando a demonstração de seus efeitos sobre a oxigenação em modelos de animais que tem período limitado de viabilidade de experimentação, como os coelhos.

Destaca-se que, até onde pudemos constatar, este é o primeiro estudo que analisou os efeitos do NOi em modelo experimental de SDRA em coelhos submetidos a VM protetora.

Além da oxigenação, o modelo de lavagem com salina aquecida causa reação inflamatória com aumento da permeabilidade vascular e ativação de PMN no BAL⁷⁷. O NOi, entretanto, pode modificar a liberação de citocinas bem como a de outros mediadores inflamatórios⁷⁶. O gás tem efeito inibitório sobre a ativação de moléculas de adesão que refletem o número de neutrófilos PMN na área de lesão pulmonar⁷⁸. Observamos significativo decréscimo do número de PMN para os animais do GVM-NO comparado ao GVM, indicando que o gás influenciou a migração destas células, provavelmente inibindo a expressão de moléculas de adesão nestas células e seus ligantes ao endotélio⁵⁸.

Quanto aos achados histopatológicos típicos da SDRA/LPA, foi possível demonstrar efeito protetor do NOi, já que o escore de lesão histológica foi menor no GVM-NO comparado com o GVM e, conforme esperado, em ambos os grupos lesados o escore foi significativamente maior do que no GC. Vale a ressalva de que as análises histológicas foram efetuadas por dois patologistas experientes e que não sabiam a que grupos pertenciam os animais. Não há na literatura estudos que tenham realizado tal análise, dificultando a comparação de nossos resultados com outros estudos.

O estresse oxidativo pulmonar já foi avaliado por outros autores em modelos semelhantes ao que utilizamos. Rotta et al.(2001)⁵⁸ estudaram o estresse oxidativo

por meio da dosagem do Malondealdeído (MDA), biomarcador não específico da peroxidação lipídica⁷⁹. Este método tem sido criticado devido a sua baixa sensibilidade e especificidade⁸⁰. Utilizando outro marcador de estresse oxidativo (mieloperoxidase) em modelo de aspiração de suco gástrico em coelhos, foi demonstrada redução da lesão oxidativa pulmonar em ventilação oscilatória de alta frequência⁸¹. Muito embora o método da dosagem de mieloperoxidase associe-se a lesão envolvendo células inflamatórias, ele apenas avalia atividade oxidante de neutrófilos e outras células contendo mieloperoxidase⁸².

Nós demonstramos que a VM protetora associada ao NOi determina melhor capacidade antioxidante medida pelo TAP. Vários fatores podem ter influenciado este resultado. Tem sido mostrado que NOi não diminui a resposta inflamatória quando a inflamação já está em progresso. Entretanto, seu uso precoce pode atenuar o processo inflamatório pulmonar⁸³. Também, baixas doses do gás parecem ser benéficas enquanto que altas doses podem contribuir para a lesão inflamatória^{83,84}. Assim, é possível que a introdução precoce e a baixa dose de NOi (5ppm) utilizadas neste estudo possam ter atenuado a lesão pulmonar oxidativa.

5. Conclusões

Óxido nítrico inalatório reduz a lesão pulmonar inflamatória e histopatológica e atenua a lesão oxidativa do tecido pulmonar em modelo de LPA induzida por lavagem alveolar com salina aquecida em coelhos submetidos a ventilação mecânica protetora.

6. Referências Bibliográficas

1. Redding GJ. Current concepts in adult respiratory distress syndrome in children. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13:261-266.
2. Fioretto JR, Ferrari GF, Ricchetti SMQ et al. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo em Crianças: Incidência, Mortalidade e Trocas Gasosas. *RBTI* 2001; 2:58-62.
3. Fioretto JR, Bonatto RC, Carpi MF et al. Óxido nítrico inalatório para crianças com síndrome do desconforto respiratório agudo. *RBTI* 2006; 18:407-411.

4. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338:347–354.
5. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, and Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999; 282: 54–61.
6. Dreyfuss D and Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 294–23.
7. Parker JC, Hernandez LA, and Peevy KJ. Mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 1993; 21:131–143.
8. Slutsky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest* 1999; 116: 9S–15S.
9. Bream-Rouwenhorst HR, Beltz EA, Ross MB et al. Recent developments in the management of acute respiratory distress syndrome in adults. *Am J Health-Syst Pharm* 2008; 65:29-36.
10. Radermacher P, Santak P, Becker H, et al. Prostaglandin E1 and nitroglycerin reduce pulmonary capillary pressure but worsen V/Q distribution in patients with adult respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1989; 70:601-609.
11. Hsu CW, Lee DL, Lin SL et al. The initial response to inhaled nitric oxide treatment for intensive care unit patients with acute respiratory distress syndrome. *Respiration* 2008; 75:288-295.
12. Fioretto JR, de Moraes MA, Bonatto RC et al. Acute and sustained effects of early administration of inhaled nitric oxide to children with acute respiratory distress syndrome. *Pediatr Crit Care Med* 2004; 5:469-474.
13. Maurenbrecher H, Lamy M, Deby-Dupont G et al. An animal model of response and nonresponse to inhaled nitric oxide in endotoxin-induced lung injury. *Chest* 2001; 120:573–581.
14. Ciencewicz J, Trivedi S, and Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:456-68.
15. Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L1137-45.
16. Grune T, Berger MM. Markers of oxidative stress in ICU clinical settings: present and future. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 712-717.
17. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; 202:145-156.
18. Auten RL and Davis JM. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatr Research* 2009; 2:121-7.
19. Quinlan GJ, Evans TW, Gutteridge JM. Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res* 1994; 20:289-298.
20. Roumen RM, Hendriks T, de Man BM, Goris RJ. Serum lipofuscin as a prognostic indicator of adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Br J Surg* 1994;81:1300-5.
21. Ware LB. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 2006; 27:337-49.
22. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004;202:145-56.
23. Kumar KV, Rao SM, Gayani R, Mohan IK, Naidu MU. Oxidant stress and essential fatty acids in patients with risk and established ARDS. *Clin Chim Acta* 2000; 298: 111-120.

24. Siler TM, Swierkosz JE, Hyers TM, Fowler AA, Webster RO. Immunoreactive interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of high-risk patients and patients with the adult respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res* 1989;15:881-94.
25. Kietzmann D, Kahl R, Müller M, Burchardi H, Kettler D. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med* 1993;19:78-81.
26. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-37.
27. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995; 268: L699-722.
28. Baldus S, Castro L, Eiserich JP, Freeman BA. Is NO news bad news in acute respiratory distress syndrome? *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 308-10.
29. Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, et al. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 503-10.
30. van der Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga MK, Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract. Epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease? *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1-9.
31. Haddad IY, Zhu S, Crow J, Barefield E, Gadilhe T, Matalon S. Inhibition of alveolar type II cell ATP and surfactant synthesis by nitric oxide. *Am J Physiol* 1996; 270: L898-906.
32. Knepler JL Jr, Taher LN, Gupta MP, et al. Peroxynitrite causes endothelial cell monolayer barrier dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C1064-75.
33. Szabo C, Cuzzocrea S, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock. Importance of the activation of poly (ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 1997; 100: 723-35.
34. Zouki C, Zhang SL, Chan JS, Filep JG. Peroxynitrite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway. *FASEB J* 2001; 15: 25-7.
35. Bloomfield GL, Holloway S, Ridings PC, et al. Pretreatment with inhaled nitric oxide inhibits neutrophil migration and oxidative activity resulting in attenuated sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 1997; 25:584-593.
36. Chollet-Martin S, Gatecel C, Kermarrec N, et al. Alveolar neutrophil functions and cytokine levels in patients with the adult respiratory distress syndrome during nitric oxide inhalation. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:985-990.
37. Rubbo H, Radi R, Anselmi D, et al. Nitric oxide reaction with lipid peroxyl radicals spares α -tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/ α -tocopherol than α -tocopherol/ascorbate. *J Bio Chem* 2000; 275:10812-10818.
38. Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, et al. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:503-510.
39. Laroux FS, Pavlick KP, Hines IN et al. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol Scand* 2001; 173:113-118.
40. Friese RS, Fullerton DA, McIntyre RC Jr, et al. NO prevents neutrophil-mediated pulmonary vasomotor dysfunction in acute lung injury. *J Surg Res* 1996; 63:23-8.
41. Neviere R, Guery B, Mordon S, et al. Inhaled NO reduces leukocyte-endothelial cell interactions and myocardial dysfunction in endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1783-90.

42. Miller OI, Tang SF, Keech A, Pigott NB, Beller E, Celermajer DS. Inhaled nitric oxide and prevention of pulmonary hypertension after congenital heart surgery: a randomised double-blind study. *Lancet* 2000; 356:1464–9.
43. Gaies MG, Gurney JG, Yen AH, et al. Vasoactive-inotropic score as a predictor of morbidity and mortality in infants after cardiopulmonary bypass. *Pediatr Crit Care Med* 2010; 11:234-238.
44. Viana MEG, Sargentelli GA, Arruda ALM et al. The impact of mechanical ventilation strategies that minimize atelectrauma in an experimental model of acute lung injury. *J Pediatr (Rio J)* 2004; 80:189-196.
45. Imai Y, Nakagawa S, Ito Y, et al. Comparison of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation. *J Appl Physiol* 2001; 91:1836-1844.
46. Lachmann B, Robertson B and Vogel J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesth Scand* 1980; 24:231-236.
47. Fioretto JR. Uso do óxido nítrico em pediatria. *J Pediatr (Rio J)* 2003; 79(Supl.2):S177-S186.
48. Mrozek JD, Smith KM, Bing DR, et al. Exogenous surfactant and partial liquid ventilation: physiologic and pathologic effects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1058-1065.
49. Rotta AT, Gunnarsson B, Hernan LJ et al. Partial liquid ventilation influences pulmonary histopathology in an animal model of acute lung injury. *J Crit Care* 1999; 14:84-92.
50. Aldini G, Yeum KJ, Russell RM, et al. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:1043–1050.
51. Lamb NJ, Gutteridge JM, Baker C, Evans TW, Quinlan GJ. Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. *Crit Care Med* 1999; 27:1738-1744.
52. Beretta G, Aldini G, Facino RM, et al. Total Antioxidant Performance (TAP): a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem* 2006; 354:290-298.
53. Mallory GB, Jr. Surfactant proteins: role in lung physiology and disease in early life. *Paediatr Respir Rev* 2001; 2:151-158.
54. Derdak S, Mehta S, Stewart TE, et al. High-frequency oscillatory ventilation for acute respiratory distress syndrome in adults: a randomized, controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:801-808.
55. Ferreira ALA, Yeum KJ, Matsubara LS, et al. Doxorubicin as an Antioxidant: Maintenance of Myocardial Levels of Lycopene under Doxorubicin Treatment. *Free Radic Biol Med* 2007; 43:740–751.
56. Miles AM, Wink DA, Cook JC, et al. Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymol* 1996; 268:105–120.
57. Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, et al. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem* 1993; 214:11–16.
58. Rotta AT, Gunnarsson B, Fuhrman BP, et al. Comparison of lung protective ventilation strategies in a rabbit model of acute lung injury. *Crit Care Med* 2001; 29:2176-2184.
59. Imai Y, Nakagawa S, Ito Y, et al. Comparison of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation. *J Appl Physiol* 2001; 91:1836-1844.

60. Muir WW. Manual de anestesia veterinária. *Anestesia em coelhos*. 3ª Ed. São Paulo: Artmed; 1993. p312-316.
61. National Research Council of USA. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington, DC: National Academy Press; 2000. p59.
62. Maurenbrecher H, Lamy M, Deby-Dupont G et al. An animal model of response and nonresponse to inhaled nitric oxide in endotoxin-induced lung injury. *Chest* 2001; 120:573–581.
63. Lachmann B, Robertson B, Vogel J. in vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand* 1980; 24: 231–236.
64. Hawgood S, Clements JA. Pulmonary surfactant and its apoproteins. *J Clin Invest* 1990; 86: 1–6.
65. Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* 1997; 77: 31–962.
66. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: L379–L399.
67. Wang HM, Bodenstein M, Markstaller K. Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury. *Eur Surg Res* 2008; 40:305–316.
68. Mallory G. Surfactant proteins: role in lung physiology and disease in early life. *Paediatr Respir Rev* 2001; 2:151–158.
69. Hsu CW, Lee DL, Lin SL et al. The initial response to inhaled nitric oxide treatment for intensive care unit patients with acute respiratory distress syndrome. *Respiration* 2008; 75:288-295.
70. Fioretto JR. Óxido nítrico inalatório na síndrome do desconforto respiratório agudo. *Rev Paul Ped* 2000; 18:201-204.
71. Cuthbertson BH, Dellinger P, Dyar OJ et al. UK guidelines for the use of inhaled nitric oxide therapy in adult ICUs. *Intensive Care Med* 1997; 23:1212-1218.
72. Fioretto JR, Carpi MF, and Bonatto RC. In: *Inhaled nitric oxide for children with acute respiratory distress syndrome*. Esquinas A and Volsko TA (Eds). Murcia, Tipografia San Francisco S.A., 2008, pp.747-751.
73. Bastarache J.A. Blackwell T.S. Development of animal models for the acute respiratory distress syndrome. *Dis Model Mech* 2009; 2, 218-223.
74. Gust R, McCarthy TJ, Kozlowski J, et al. Response to inhaled nitric oxide in acute lung injury depends on distribution of pulmonary blood flow prior to its administration. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:563–570.
75. Hampl V, Cornfield DN, Cowan NJ et al. Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells. *Eur Respir J* 1995; 8:515–522.
76. Weimann J, Bloch KD, Takata M et al. Congenital NOS2 deficiency protects mice from LPS-induced hyporesponsiveness to inhaled nitric oxide. *Anesthesiology* 1999; 91:1744–1753.
77. Imai T, Fujita T. Unilateral lung injury caused by ischemia without hypoxia in isolated rat lungs perfused with buffer solution. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 830–836.
78. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:4651–4655.
79. Vahlquist A and Duvic M. Retinoids and carotenoids in dermatology. *JAMA* 2008; 299:1611-1612.
80. Grotto D, Maria LS, Valentine J, et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova* 2009; 32:169-174.

81. Allardet-Servent J, Bregeon F, Delpierre S, et al. High-frequency percussive ventilation attenuates lung injury in a rabbit model of gastric juice aspiration. *Intensive Care Med* 2008; 34:91-100.
82. Winterbourn CC and Kettle AJ. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:403-409.
83. Wang T, Kebir DE, Blaise G. Inhaled nitric oxide in 2003: a review of its mechanisms of action. *Can J Anesth* 2003; 50:839-846.
84. Edwards AD. The pharmacology of inhaled nitric oxide. *Arch Dis Child* 1995; 72:F127-F130.