

Carlos Fernando Ronchi

**Efeito de diferentes técnicas de ventilação
mecânica sobre o estresse oxidativo pulmonar
induzido por lesão pulmonar aguda
experimental**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Fisiopatologia em Clínica
Médica, da Faculdade de Medicina de
Botucatu - UNESP para obtenção do título de
doutor

Orientador: Professor Adjunto José Roberto Fioretto

Co-Orientadora: Professora Adjunta Ana Lúcia dos Anjos Ferreira

Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Ronchi, Carlos Fernando.

Efeito de diferentes técnicas de ventilação mecânica sobre o estresse oxidativo pulmonar induzido por lesão pulmonar aguda experimental / Carlos Fernando Ronchi. – Botucatu : [s. n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: José Roberto Fioretto

Capes: 40101126

1. Pulmões - Doenças. 2. Stress (Fisiologia). 3. Antioxidantes. 4. Respiração artificial.

Palavras-chave: Antioxidantes; Estresse oxidativo; Lesão pulmonar aguda; Ventilação mecânica convencional; Ventilação oscilatória de alta frequência.

*À minha esposa Carolina, por todo o amor,
carinho, apoio e companheirismo durante todo
esse tempo...*

TE AMO!!!

Aos Meus Pais que tanto amo, Carlos e Ana, agradeço pelos ensinamentos mais importantes, que me fizeram chegar até aqui e que com certeza levarei por toda a minha vida!

Ao meu irmão Eduardo, que muito admiro por sua dedicação e seriedade, serei sempre grato por sua amizade e apoio.

Aos meus avós, João, Jandira, Antonio (in memoriam) e Octacília, que sempre me mostraram o melhor caminho com muito amor, vocês são como pais para mim!

Ao meu orientador, José Roberto Fioretto, que sempre me deu todo apoio profissional e também como amigo, me ensinando a ser não somente um pesquisador, mas também um ser humano melhor, agradeço muito por toda confiança e ensinamentos.

À minha co-orientadora e amiga, Ana Lúcia Ferreira, se precisasse de palavras para descrever o que você significa para mim no ensinamento de vida profissional eu a chamaria de mãe... Muito obrigado por todo amor, dedicação e apoio.

À minha supervisora de estágio em Boston, Kyung-Jin Yeum, por tudo que fez durante minha estadia em seu laboratório, em um momento em que tudo parecia estar tão longe você fez parecer mais perto.

Aos meus amigos quase irmãos, Paulão, Tuca, Marcel (Zé) e Alexandre (Véio), que perto ou longe, com relação ao quesito distância, vocês sempre estiveram próximos pela nossa amizade!

Aos meus amigos, ou seria melhor dizer, meus familiares, Marcio, Camila e Marina Camacho, vocês entraram em minha vida de uma forma muito especial, tenho um carinho enorme por vocês!

Ao casal André e Renata, que também fazem parte desta família que cultivei durante a minha vida, obrigado pela presença sempre constante!

Um grande abraço...

Agradeço a Deus que com a graça do Espírito Santo, Sua luz, sabedoria e discernimento me levaram a pesquisar e colher bons frutos com este trabalho, e com tenacidade, naveguei sempre como um navio que em alto mar enfrenta desafios contra a tempestade. Foram longas horas de estudo, dedicação e também vários momentos de dificuldades e incertezas... Mas que com a força e graça divina foram concretizadas.

Faço aqui um agradecimento especial à Cilmerly, que com sua paciência, amizade e dedicação sempre me ajudou no aprendizado das técnicas de laboratório e a tornar possível a realização deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório experimental da Pediatria e Clínica Médica-UNESP, e também a todos do Carotenoids & Health Lab-Tufts University por sua ajuda na realização deste trabalho.

Aos funcionários da UTI do Pronto Socorro que sempre tiveram uma participação importante em minha vida profissional.

Agradeço à Mariana Braz, por sua ajuda e ensinamentos durante meu aprendizado da técnica para avaliação da lesão de DNA (teste do cometa).

Aos funcionários do Setor de Reabilitação, especialmente à Sandra Volpi, que me apoiou de forma com que eu pudesse tornar possível a realização deste sonho.

A todos os funcionários da Pós-Graduação da Unesp (em especial à Regina, Lilian, Natanael, Janete, Andréia) que sempre estão dispostos a ajudar com carinho e dedicação.

À Ana Mengue, secretária da Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica, por toda ajuda e atenção.

Um agradecimento especial também ao Paulinho, responsável pela reserva de salas, mas especialmente pela sua amizade e dedicação em ajudar sempre que possível.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

A todos meus familiares e amigos que mesmo sem seus nomes presente de forma explícita, me incentivaram e apoiaram em minhas conquistas

Ao professor Carlos Roberto Padovani, que sempre nos auxiliou e orientou com relação às análises estatísticas.

À Fapesp pelo auxílio financeiro.

*A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao
seu tamanho original.*

Albert Einstein

ÍNDICE

I- Fundamentação e Justificativa da Tese.....	12
1- Lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório agudo.....	13
1.1 Fisiopatologia e Critérios Diagnósticos.....	13
1.2 Fases Evolutivas.....	14
1.3 Etiologia.....	16
1.4 Tratamento Ventilatório da LPA/SDRA.....	16
1.4.1 Ventilação Mecânica Protetora.....	16
1.4.2 Ventilação Oscilatória de Alta Frequência.....	18
 2 – Estresse oxidativo.....	 20
 3- Referências Bibliográficas.....	 27
 II- A Tese (artigo publicado).....	 37
Resumo	38
1- Introdução.....	40
2 – Objetivos.....	42
3- Métodos.....	42
3.1 Planejamento, animais e instrumentação.....	42
3.2 Indução da lesão pulmonar aguda	43
3.3 Medida da complacência pulmonar	44
3.4 Grupos experimentais	44
3.5 Coleta do tecido	45
3.6 Lavado broncoalveolar	45
3.7 Análise histopatológica.....	45
3.8 Análise da capacidade antioxidante total no tecido pulmonar.....	46
3.9 Análise estatística.....	47
 4- Resultados.....	 48
4.1 Hemodinâmica, mecânica pulmonar e troca gasosa.....	48
4.2 Lesão pulmonar oxidativa.....	52
4.3 Lesão histopatológica.....	52
4.4 Contagem de células polimorfonucleares.....	53
 5- Discussão.....	 54

6- Limitações do estudo	57
7- Conclusões.....	58
8- Referências Bibliográficas.....	60
9. Cópia do artigo publicado.....	66
III- Desdobramentos da tese.....	75
1. Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury induced in rabbits submitted to different strategies of mechanical ventilation.....	76
2. Interactive effects of mechanical ventilation, inhaled nitric oxide and oxidative stress in acute lung injury.....	105
IV- Comentários Finais.....	108
Anexos	
Anexo 1 – Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa.....	110

I – Fundamentação e Justificativa da Tese

Este estudo teve como foco de análise a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), sua fisiopatologia e principais formas de tratamento.

A SDRA corresponde à manifestação mais grave de lesão pulmonar aguda (LPA)¹⁻³. Apesar do progresso no entendimento de sua fisiopatologia e consequente avanço em estratégias terapêuticas, a mortalidade permanece elevada, variando de 40% a 60%⁴⁻⁶.

O exato mecanismo que leva a SDRA é desconhecido⁷, contudo, várias evidências sugerem que pacientes portadores da síndrome estão expostos a elevado grau de estresse oxidativo (EO) induzido por grande variedade de eventos⁸⁻¹¹. O EO é resultante do desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou de nitrogênio (RNS) e consequente lesão oxidativa em biomoléculas¹². Alguns estudos demonstraram que existe redução de antioxidantes em pacientes com SDRA^{13,14}. Entretanto, não há evidência clínica de que a suplementação com antioxidantes possa reduzir mortalidade ou morbidade. Por outro lado, a ventilação pulmonar mecânica (VM) constitui um dos principais pilares do tratamento da SDRA⁵, sendo capaz de modificar a evolução da doença e reduzir a mortalidade¹⁵. Existem dois métodos ventilatórios de proteção pulmonar utilizados na SDRA, um baseado na VM convencional (VMC)¹⁶ e outro na ventilação oscilatória de alta frequência¹⁷⁻¹⁹.

Apresentaremos a seguir breve revisão dos principais elementos que motivaram a realização desta tese e que foram levados em consideração para a elaboração da hipótese do trabalho.

1. Lesão pulmonar aguda/Síndrome do desconforto respiratório agudo

Ashbaugh et al.¹, em 1967, utilizaram o termo “síndrome da angústia respiratória do adulto” para descrever um quadro agudo de insuficiência respiratória grave que evoluía com elevada taxa de mortalidade. A síndrome foi descrita em 11 adultos e uma criança e foi caracterizada por edema pulmonar não cardiogênico que cursava com taquidispnéia, cianose refratária à administração de oxigênio, presença de infiltrado alveolar bilateral ao exame radiológico do tórax e diminuição da complacência pulmonar. Posteriormente, julgou-se mais apropriado o termo Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo para designar tais casos, dado o caráter agudo da doença e o fato de serem acometidos, indistintamente, adultos e crianças. Além disso, levando-se em conta que os quadros de insuficiência respiratória aguda podem ser a base fisiopatológica em uma grande variedade de agravos e que pequena porcentagem de pacientes com insuficiência respiratória desenvolve as alterações clássicas da SDRA, foi elaborado um conceito mais amplo que engloba todos os casos de falência respiratória. A denominação genérica adotada foi Lesão Pulmonar Aguda. A LPA e a SDRA são fenômenos evolutivos de um mesmo processo patológico sendo que a SDRA corresponde à fase mais grave do mesmo.

1.1 Fisiopatologia e Critérios Diagnósticos

A SDRA é a forma clínica mais grave e o espectro final da LPA. A doença caracteriza-se por processo inflamatório extenso que leva à quebra da barreira alvéolo-capilar com desenvolvimento de edema intersticial e alveolar, diminuição da complacência pulmonar, desequilíbrio da relação ventilação/perfusão (relação V/Q) e hipoxemia refratária à administração de oxigênio²⁰. A lesão dos pneumócitos do

tipo II, produtores de surfactante, e a inativação do surfactante pelo processo inflamatório também contribuem para o colapso expiratório de unidades alveolares, com redução da capacidade residual funcional. Além disso, existe aumento da resistência vascular pulmonar produzido por combinação complexa de lesão pulmonar primária, decorrente da resposta inflamatória à agressão pulmonar, e de complicações do tratamento, principalmente a lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica. A hipertensão pulmonar impõe carga adicional ao ventrículo direito, limitando o débito cardíaco²¹.

Os critérios diagnósticos da síndrome foram estabelecidos em 1994 na Conferência de Consenso Americana-Européia²², sendo eles: 1) presença de evento agudo desencadeante de lesão pulmonar; 2) evidência de hipoxemia refratária à administração de oxigênio demonstrada por relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg para SDRA e ≤ 300 para LPA, a despeito da pressão expiratória final positiva utilizada; 3) presença de infiltrado bilateral na radiografia de tórax em posição frontal e 4) pressão capilar pulmonar ≤ 18 mmHg, quando medida, ou ausência de evidência clínica de hipertensão atrial esquerda.

Apesar do melhor entendimento da fisiopatologia da doença e do avanço tecnológico observado na monitoração e no tratamento de pacientes gravemente doentes, a mortalidade por LPA/SDRA permanece elevada, variando de 31% a 60% em adultos¹⁶ e de 43% a 62% em crianças^{23, 24}.

1.2 Fases Evolutivas

Do ponto de vista anatomopatológico, a evolução da SDRA pode ser dividida em três fases inter-relacionadas que correspondem à evolução clínica da doença:

fase exsudativa, de edema e hemorragia; fase proliferativa, de organização e reparação e fase fibrótica terminal²⁵.

A fase exsudativa ocorre durante a primeira semana após o início da insuficiência respiratória aguda. Macroscopicamente os pulmões apresentam-se rígidos, de coloração avermelhada escura e estão extremamente pesados. A superfície parenquimatosa é hemorrágica, de consistência firme e não aerada. Microscopicamente observa-se congestão capilar, edema intersticial e alveolar e hemorragia intra-alveolar. Esta fase é caracterizada pela presença de membranas hialinas eosinofílicas, usualmente vistas após as primeiras 48 horas. Essas membranas são compostas de proteínas plasmáticas condensadas, mais evidentes ao longo do ducto alveolar, obstruindo as saídas dos alvéolos adjacentes²⁵. Há evidências de alterações ultra-estruturais do endotélio, como edema celular, alargamento das junções intercelulares e aumento da quantidade de vesículas pinocitárias. O epitélio alveolar apresenta necrose extensa dos pneumócitos tipo I, mais susceptíveis à lesão. Esta perda da barreira epitélio-alveolar permite extravasamento do líquido intersticial para o espaço alveolar.

A fase proliferativa ocorre entre a primeira e a terceira semana de evolução da doença e representa o estágio de organização dos exsudatos intra-alveolares e intersticiais produzidos na fase aguda. Os pulmões apresentam-se duros, com coloração cinza claro e com textura lisa atribuível à presença de tecido conjuntivo recém formado. O epitélio torna-se cubóide, com proliferação de pneumócitos tipo II ao longo dos septos alveolares. A regeneração das células epiteliais marca o início desta fase, podendo haver atipia nuclear. No interior da parede alveolar existe proliferação de fibroblastos e miofibroblastos, que posteriormente migram para o

exsudato intra-alveolar fibrinoso. Os fibroblastos convertem o exsudato em tecido de granulação e posteriormente, pela deposição de colágeno, em tecido fibroso.

A fase fibrótica inicia-se após a primeira semana de evolução da síndrome. Após três a quatro semanas o pulmão é totalmente remodelado por tecido colágeno. Macroscopicamente a superfície pleural apresenta aspecto grosseiro e o parênquima pulmonar é pálido e esponjoso, apresentando áreas de espaços aéreos microcísticos com diâmetro de um a dois milímetros e zonas de retração (padrão em favos de mel). Os brônquios periféricos são dilatados e anormalmente próximos da superfície da pleura visceral. As artérias parecem serpentinas e, histologicamente, apresentam espessamento fibroso de suas paredes. Microscopicamente os septos alveolares e as paredes dos espaços aéreos são compostos de tecido colágeno com células esparsas. Os espaços aéreos apresentam dilatação irregular^{25, 26}.

1.3 Etiologia

A LPA/SDRA pode ser causada por agressão pulmonar direta (primária), como ocorre na aspiração, infecção pulmonar, quase-afogamento e contusão pulmonar, ou pode ser provocada por agressão indireta (secundária), como na sepse, politraumatismo, em transfusões maciças de hemoderivados, entre outras²⁷.

1.4 Tratamento Ventilatório da LPA/SDRA

1.4.1 Ventilação Mecânica Protetora

A VM é fundamental para o tratamento na medida em que melhora a oxigenação por recrutamento alveolar, com restabelecimento da relação V/Q²⁴. No entanto, embora as manobras ventilatórias possam melhorar a oxigenação arterial, elas não reduzem a hipertensão pulmonar. Além disso, com a progressão da

insuficiência respiratória pode ser necessário o emprego de volume corrente (VC) e de pressões inspiratórias elevadas (pressão de pico e pressão de platô).

Em três trabalhos do grupo de Gattinoni²⁷⁻²⁹ foi observado, por meio de estudo tomográfico dos pulmões, que o comprometimento do parênquima pulmonar não é homogêneo na síndrome, existindo áreas de pulmão normal juntamente com áreas extremamente condensadas e outras mediantemente lesadas. Paralelamente, diversas publicações³⁰⁻³³ alertaram para a ocorrência de lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (LPiVM) devido aos altos valores de volume corrente (10-15 mL/Kg) e de pico de pressão inspiratória (> 40 cmH₂O) aplicados, até então, rotineiramente.

A idéia que predomina atualmente é a de que o emprego de altos volumes correntes, que geram altas pressões inspiratórias na VM de pacientes com LPA/SDRA, determina lesão estrutural em áreas de pulmão até então sadias (volutrauma e barotrauma), reproduzindo as lesões anatomopatológicas da SDRA nestas áreas, agravando a hipoxemia e piorando a evolução dos pacientes³⁴. Além disso, ciclos sucessivos de abertura e fechamento dos alvéolos sadios podem determinar colapso ou “afrouxamento” destas unidades de troca gasosa, o que se convencionou chamar de atelectrauma. Além disso, a VM mais agressiva pode propiciar a passagem de mediadores inflamatórios liberados nos alvéolos para a circulação pulmonar e daí para a circulação sistêmica, podendo ocasionar disfunções orgânicas extra-pulmonares (biotrauma)³⁵.

Estes conhecimentos determinaram modificação substancial na maneira de utilizar VM nestes pacientes, sendo introduzido o conceito de VM protetora. Assim, a recomendação atual para VM protetora em LPA/SDRA é a de que se utilize volume corrente de 5 a 7 mL/Kg, limitando a pressão de platô em 30 cmH₂O. A VM protetora

tolera níveis de saturação arterial de oxigênio (SaO_2) entre 88% e 90% (hipoxemia permissiva) além de níveis de PaCO_2 de até 100 mmHg (hipercapnia permissiva)¹⁶. Além disso, a pressão expiratória final positiva (PEEP) deve ser ajustada para manter aberta a maioria das unidades alveolares e prevenir seu colapso no final da expiração³⁶ e, com isso, reduzir o *shunt* intrapulmonar e melhorar a hipoxemia. A otimização da PEEP, na medida que impede a abertura e o fechamento cíclicos dos alvéolos, reduz a LPIVM.

O ponto de inflexão inferior do ramo inspiratório da curva pressão/volume (P/V) tem sido proposto como ponto de referência para se encontrar a PEEP ideal. Na prática clínica, o nível da PEEP ideal tem sido obtido à beira do leito, aumentando-se essa pressão de 2 a 3 cmH_2O , gradualmente, e acompanhando seu efeito sobre a SaO_2 . Na UTIP da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP temos utilizado PEEP mínima de 10 cmH_2O , na fase inicial do tratamento de lactentes e crianças com LPA/SDRA, aumentando gradualmente seu nível de 2 a 3 cmH_2O de acordo com a resposta da SaO_2 , fixando o valor que se determina melhor SaO_2 , entre 88% e 90% sem causar sinais de hiperinsuflação pulmonar no exame radiológico de tórax³⁷.

1.4.2 Ventilação Oscilatória de Alta Frequência

Embora a VM protetora convencional (VMC) seja efetiva para a maioria das crianças, há um número significativo de pacientes com insuficiência respiratória grave onde a VMC pode não garantir a oxigenação e a ventilação. Nestes casos, a ventilação oscilatória de alta frequência (VAF) passa ser uma alternativa atraente por suas características únicas³⁸.

A VAF é um modo ventilatório que utiliza volume corrente menor do que o volume do espaço morto anômico (1–3 mL/Kg) e frequência bem acima da fisiológica (3–15 Hertz, ou seja, 180–900 ciclos/minuto). Esta forma de ventilação vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de pacientes com insuficiência respiratória grave quando a VMC falha. Além disso, há relatos de que quando a VAF é utilizada precocemente, ocorre redução na lesão pulmonar aguda e crônica em pacientes com SDRA³⁹.

O ventilador mecânico com o qual a VAF é aplicada é um aparelho com fluxo contínuo de gás que é capaz de eliminar o CO₂ e manter constante a pressão da via aérea. O ventilador é dotado de um pistão eletromagnético capaz de gerar oscilação de alta frequência sobre o fluxo aéreo, determinando a amplitude de oscilação da pressão. Em contraste com a VMC, na VAF o volume corrente é inversamente relacionado à frequência e tanto a inspiração como a expiração são ativas. A pressão de amplitude é maior no circuito do ventilador e na porção proximal da traquéia, diminuindo progressivamente ao longo da via aérea, resultando em baixa pressão de amplitude nos alvéolos⁴⁰.

A combinação de pequena variação de volume e pressão e manutenção de pressão média de vias aéreas (MAP) tornam o uso da VAF atrativo na LPA/SDRA. Além disso, a manutenção do volume pulmonar, que evita superdistensão pulmonar e aparecimento de atelectasia em pacientes com SDRA, e seu padrão de fluxo pode melhorar a relação V/Q⁴⁰.

Foi demonstrado em crianças com SDRA melhora significativa na oxigenação, redução da frequência de barotrauma e melhora dos resultados clínicos com o uso da VAF⁴⁰. Em adultos com SDRA foi descrita melhora imediata e sustentada da relação PaO₂/FiO₂ quando os pacientes foram submetidos à VAF combinada com

manobras de recrutamento alveolar⁴¹. Como efeito benéfico adicional, foi demonstrado redução dos níveis de mediadores inflamatórios em amostras de lavado broncoalveolar de pacientes sob VAF quando comparado com a VMC⁴².

Atualmente, muita atenção tem sido dada a utilização precoce da VAF⁴³. Assim, quando em vigência de $\text{FiO}_2 \geq 0,6$, pressão inspiratória (Pip) de 30-32 cmH₂O e PEEP ≥ 10 cmH₂O, recomenda-se a mudança da ventilação convencional para a VAF⁴⁴.

2. Estresse oxidativo

Embora o mecanismo que leva a LPA/SDRA ainda não esteja totalmente elucidado, existem evidências de que as espécies reativas de oxigênio (ROS) determinem lesão endotelial vascular e epitelial pulmonar⁷, sendo, assim responsáveis pelo desenvolvimento e progressão da SDRA⁸.

As ROS são continuamente geradas pelo metabolismo fisiológico⁹ e o aumento na sua geração ou a diminuição da capacidade antioxidante pode estar envolvida na patogênese da SDRA¹⁰. Além disso, o processo inflamatório, característico da doença, rompe a barreira alvéolo-capilar com edema intersticial e alveolar^{11, 12}. Estes efeitos podem comprometer a viabilidade das células ou induzir variedade de respostas celulares por meio da geração de espécies reativas secundárias, levando à morte celular por necrose ou apoptose^{13, 14}.

O papel do EO na fisiopatologia da SDRA foi inicialmente abordado por Lee et al. 1981⁴⁵, McGuire et al. 1982⁴⁶, Williams et al. 1982⁴⁷, Williams and Chance, 1983⁴⁸ e Cochrane et al. 1983⁴⁹. Segundo estes autores, a SDRA corresponde a um evento parcialmente associado ao acúmulo de lesão oxidativa em biomoléculas⁵⁰.

A seguir apresentaremos os conceitos mais importantes a respeito do EO.

O EO é um evento resultante do desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a geração de ROS ou espécies reativas de nitrogênio (RNS). As ROS são geradas tanto por sistemas enzimáticos como não-enzimáticos e têm sido implicadas em grande número de processos fisiológicos⁵¹, não-fisiológicos e na iniciação e progressão de doenças⁵². As principais ROS são: hidroxil ($\bullet\text{OH}$); superóxido ($\text{O}_2^-\bullet$); peroxinitrito (ONOO^-); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); *singlet* oxigênio ($^1\text{O}_2$); óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$); ácido hipocloroso; radical hidroperóxil; radical alcóxil ($\text{LO}\bullet$) e hidroperóxido [L(R)OOH]. As fontes geradoras de espécies reativas são as que se seguem: redução incompleta do O_2 (mitocôndria); macrófagos e neutrófilos; endotélio; epitélio; sistemas enzimáticos (Mieloperoxidase, Xantina oxidase, NADPH-oxidase, NADPH-citocromo P450 redutase, ciclo-oxigenase, NO-sintetase); reações com metal (Ferro e Cobre) por meio das Reações de Fenton (Fe^{+++}) e de Haber-Weiss (Fe^{++}) e reação não enzimática entre os radicais superóxido e óxido nítrico resultando na geração de peroxinitrito. Embora as ROS sejam essenciais para uma variedade de mecanismos de defesa celular⁵³, elas e as RNS podem causar lesão oxidativa em biomoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA) quando presentes em concentração superior à sua neutralização, mediada pelo sistema de defesa antioxidante.

O sistema de defesa antioxidante é constituído por vários componentes localizados no compartimento aquoso e no lipídico. Os antioxidantes do compartimento aquoso incluem: glutatona (GSH); glutatona-peroxidase (GSH-Px); glutatona-redutase (GSH-Rd); superóxido dismutase (SOD); catalase, vitamina C; ácido úrico; albumina; hemoglobina; transferrina; bilirrubina e flavonóides. Os antioxidantes do compartimento lipídico incluem: vitamina E (principalmente α -tocoferol) e carotenóides (β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina,

astaxantina, cataxantina)⁵⁴. Como mencionado, o EO ocorre quando a magnitude da produção de espécies reativas supera a da capacidade antioxidante, resultando em oxidação de lipídios (lipoperoxidação), proteínas (carbonilação e/ou nitração), carboidratos (carbonilação) e DNA (oxidação de bases). A lesão desses importantes componentes celulares leva à alteração da estrutura química e da função da célula e à morte celular. Em especial, a lesão oxidativa de DNA pode ocorrer nas bases (púricas e pirimídicas) na presença de $\bullet\text{OH}$, que retira um átomo de hidrogênio das ligações C-H (carboidrato-hidrogênio) gerando falsas bases (chamadas *aducts* de bases de DNA) as quais podem ser produzidas na presença ou na ausência de oxigênio. As falsas bases geradas podem atuar como oxidantes ou como redutoras (dependendo do local onde foi retirado o átomo de Hidrogênio) e comprometem a replicação e a transcrição e, conseqüentemente, prejudicam a transmissão de informação genética⁵⁵.

Alguns estudos têm examinado o papel do estresse oxidativo na SDRA⁵⁶. Estudo prospectivo⁵⁷ mostrou que 29 pacientes portadores de SDRA apresentavam no lavado broncoalveolar (LVB) significativa diminuição de componentes do sistema de defesa antioxidante (urato, GSH e ascorbato) no momento da intubação traqueal em comparação com grupo controle. Os autores sugeriram que o nível de ascorbato pode ter sido diminuído em decorrência de sua ação contra as espécies reativas geradas pela exagerada produção de neutrófilos ativados. Por outro lado, a diminuição do urato pode ser explicada por sua função protetora contra a nitração de proteínas presentes no fluído alveolar (proteína produtora de surfactante). Já o nível diminuído de GSH identificado no estudo foi explicado pela ação neutralizadora do excesso de H_2O_2 . Estudo realizado na Nova Zelândia⁵⁸ comparou o nível de estresse oxidativo entre voluntários sadios (n=26) e pacientes portadores de SDRA

(n=30) desencadeada por sepse e por politraumatismo. Os resultados mostraram que quando comparado ao grupo de voluntários, os pacientes com SDRA apresentaram níveis plasmáticos de proteína carbonil significativamente maiores, mas semelhante valor de malondialdeído (marcador de lipoperoxidação). Outro achado interessante foi que o valor plasmático de mieloperoxidase foi maior nos pacientes que evoluíram para óbito em relação aos sobreviventes. O lavado broncoalveolar dos pacientes apresentou altos níveis de proteína carbonil com tendência à diminuição com o decorrer da evolução da doença. Foi observada correlação positiva entre mieloperoxidase e proteína carbonil e também entre mieloperoxidase e malondialdeído no lavado broncoalveolar de pacientes portadores de SDRA. Outro estudo⁵⁹ comparou portadores de SDRA com grupo controle em relação a níveis de F2-isoprostano (marcador de lipoperoxidação) ascorbato, urato, GSH e GSSG coletados no lavado broncoalveolar. Os resultados mostraram elevação de marcadores de estresse oxidativo (F2-isoprostano e GSSG) e surpreendente aumento de ascorbato, urato, α -tocoferol, sem alteração de GSH.

O EO também tem sido estudado em modelo de SDRA experimental⁶⁰. Após instilação de lipopolisacarídeo (LPS) de *E. coli* na traquéia de camundongos foi observada, via técnica de para-ressonância, a geração pulmonar de radicais superóxido e de hidroperoxil, que foi neutralizada por suplementação com inibidor de fagócito (GD Cl3). O mesmo ocorreu em relação à contagem de células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos) do lavado broncoalveolar. No mesmo estudo, os autores avaliaram o papel da enzima NADPH-oxidase na geração de radicais no pulmão e no lavado broncoalveolar em animais submetidos ao mesmo modelo experimental de SDRA. Foi observado que o grupo de animais com deficiência da enzima apresentou redução tanto do nível de superóxido como do hidro-peroxil pulmonar

em relação aos animais sem tal deficiência. Contudo, surpreendentemente, os animais com deficiência de NADPH-oxidase não apresentaram alteração na contagem de células fagocíticas no lavado broncoalveolar. Este resultado sugere que a lesão induzida por instilação traqueal com lipolissacáride é causada não apenas por radicais dependentes do sistema NADPH-oxidase (superóxido e hidroperóxido). De fato, proteases, prostaglandinas, citocinas correspondem a fontes de outros radicais importantes na SDRA.

Como relatado anteriormente, papel do EO na LPA/SDRA tem sido evidenciado tanto por estudos experimentais⁶⁰⁻⁶⁴ como por estudos clínicos^{59,65,66}. Consequentemente, estratégias terapêuticas envolvendo suplementação com antioxidantes têm sido consideradas. Estudo clínico recente mostrou que a suplementação com antioxidante (N-acetil cisteína) melhorou índices de estresse oxidativo plasmático (GSH, GSSG/GSH) e de gravidade (APACHE-II) de pacientes portadores de SDRA⁶⁶. A associação de antioxidantes (N-acetil cisteína e Desferoxamina) também atenuou a lesão oxidativa lipídica, protéica e a geração de radical superóxido em lavado broncoalveolar de ratos portadores de SDRA⁶⁷, revelando outro campo para estudos no tratamento da síndrome.

Em estudo realizado por Kinniry et al.⁶⁸, os autores mostraram que suplementação com α -tocoferol (adicionado à ração) melhorou níveis de MDA pulmonar em camundongos submetidos ao modelo de SDRA experimental (instilação traqueal de ácido clorídrico). Os resultados podem ser em parte decorrentes da ação do α -tocoferol na diminuição da migração de neutrófilo para o espaço alveolar e, portanto, melhora da lesão de endotélio e de epitélio, da diminuição da expressão de molécula de adesão do neutrófilo⁶⁹ e atenuação da produção de espécies reativas de O_2 ⁶⁸. O efeito da suplementação com mistura de

vitaminas (α -tocoferol, β -caroteno, Ascorbato) foi também estudada em pacientes portadores de SDRA⁶⁶. Os resultados mostraram que os pacientes suplementados apresentaram melhora em relação ao período de internação, desmame da ventilação mecânica e disfunção de múltiplos órgãos. Apesar do uso de antioxidantes ter mostrado algum benefício na evolução da SDRA, não há evidência clínica para o uso rotineiro dessa estratégia.

A patogênese da LPA/SDRA envolve a instalação de um fator agressor, de forma direta ou indireta, seguida por inflamação alveolar e endotelial. As principais células ativadas neste processo inflamatório são macrófagos, células epiteliais e neutrófilos. A ativação do macrófago determina a lesão de fase aguda (aumento de IL-1beta, IL-8, IL-6, fator de necrose tumoral-alfa e proteína inibidora de macrófago) e de fase tardia (estimulação de fibroblasto e de crescimento celular). A ativação de células epiteliais reduz as proteínas produtoras de surfactante e diminui a reabsorção do edema alveolar. A ativação de neutrófilos aumenta adicionalmente a liberação de citocinas inflamatórias, com incremento da apoptose neutrofílica e geração de ROS e RNS. A geração aumentada destas espécies perpetua o processo, desde que diminuam ainda mais a produção de surfactante e são capazes de re-estimular a inflamação alveolar e endotelial. Além disso, as espécies são capazes de estimular o fator NF- κ B, presente no núcleo da célula, responsável pela expressão de genes inflamatórios (IL-6, ICAM 1 etc.)^{66, 70}.

A partir do exposto, entende-se que é fundamental o papel do EO tanto na instalação como na perpetuação do processo inflamatório que ocorre na LPA/SDRA⁷¹. A produção exagerada das espécies reativas e de outros componentes desequilibra a integridade da membrana alvéolo-capilar, levando à formação da membrana hialina, marca histológica da SDRA na fase aguda, que

ocorre via reação de oxidação (lipídica e protéica). Os produtos da degradação de fibrina podem aumentar a permeabilidade vascular e causar vasoconstricção, outro fator que favorece a formação de edema^{72, 73}.

Vários métodos são utilizados para avaliar o EO. Destacam-se as seguintes aferições individualizadas: 1) oxidação das bases do DNA (teste do Cometa); 2) oxidação lipídica [(malondialdeído (MDA), isoprostanos (F2-isoprostanos)]; 3) oxidação de proteínas (Carbonilação) e; 4) oxidação de aminoácidos (Nitração). Por outro lado, outros ensaios aferem a capacidade antioxidante individual do compartimento hidrofílico (GSH, GSH-PX, SOD, Catalase, ácido úrico, bilirrubina, albumina, ascorbato) e lipofílico (carotenóides, alfa-tocoferol).

Existe muita dificuldade na interpretação dos resultados originados de medidas individuais de componentes do sistema de defesa antioxidante e também das aferições da oxidação das biomoléculas. Esta limitação estimulou alguns pesquisadores a desenvolverem outros métodos nos quais é aferido o sistema de defesa antioxidante como um todo, como o TRAP (antioxidantes sequestrantes de radical)⁷⁴ e o ORAC (capacidade de absorbância dos radicais de oxigênio)⁷⁵. Estes métodos utilizam geradores de radicais hidrofílicos, os quais produzem radicais apenas no compartimento aquoso do plasma. Contudo, qualquer amostra biológica é constituída pelo compartimento aquoso e pelo lipídico. Assim, devido ao fato dos antioxidantes serem hidrossolúveis ou lipossolúveis ambos os compartimentos devem ser obrigatoriamente monitorados quando se deseja avaliar a capacidade antioxidante total de amostras biológicas. Ainda é importante ser enfatizado que a ação protetora de um antioxidante resulta da ação sinérgica com outro antioxidante, seja ele do mesmo ou de outro compartimento. O método proposto por Aldini e colaboradores, o TAP (*total antioxidant performance*), contempla não apenas a

aferição de antioxidantes dos dois compartimentos, mas também mostra o resultado da interação sinérgica entre os antioxidantes⁷⁶. Essas considerações justificam a opção por esse método para aferir a capacidade antioxidante total no presente estudo.

Devido às evidências que sugerem o importante envolvimento do EO na fisiopatologia da LPA/SDRA e o papel fundamental da ventilação mecânica no tratamento destes pacientes nasceu a idéia da tese ora apresentada.

3 – Referências Bibliográficas

1. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; **2**:319-23
2. Tavaf-Motamen H, Miner TJ, Starnes BW, Shea-Donohue T. Nitric oxide mediates acute lung injury by modulation of inflammation. *J Surg Res* 1998; **78**:137-42
3. Dernaika TA, Keddissi JI, Kinasewitz GT. Update on ARDS: beyond the low tidal volume. *Am J Med Sci* 2009; **337**:360-7
4. Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet* 2007; **369**:1553-64
5. Dahlem P, van Aalderen WM, Bos AP. Pediatric acute lung injury. *Paediatr Respir Rev* 2007; **8**:348-62
6. de Hemptinne Q, Remmelink M, Brimiouille S, Salmon I, Vincent JL. ARDS: a clinicopathological confrontation. *Chest* 2009; **135**:944-49
7. Ciencewicky J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **122**:456-68; quiz 69-70

8. 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
9. 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
10. 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**:1738-44
11. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; **202**:145-56
12. Kietzmann D, Kahl R, Muller 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
13. Quinlan GJ, Evans TW, Gutteridge JM. Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res* 1994; **20**:289-98
14. Ware LB. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 2006; **27**:337-49
15. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R *et al.* Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1998; **338**:347-54

16. 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. *N Engl J Med* 2000; **342**:1301-8
17. Allardet-Servent J, Bregeon F, Delpierre S, Steinberg JG, Payan MJ, Ravailhe S, Papazian L. High-frequency percussive ventilation attenuates lung injury in a rabbit model of gastric juice aspiration. *Intensive Care Med* 2008; **34**:91-100
18. Turner DA, Arnold JH. Insights in pediatric ventilation: timing of intubation, ventilatory strategies, and weaning. *Curr Opin Crit Care* 2007; **13**:57-63
19. Girard TD, Bernard GR. Mechanical ventilation in ARDS: a state-of-the-art review. *Chest* 2007; **131**:921-9
20. Sessler CN. Mechanical ventilation of patients with acute lung injury. *Crit Care Clin* 1998; **14**:707-29, vii
21. Sibbald WJ, Driedger AA, Myers ML, Short AI, Wells GA. Biventricular function in the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1983; **84**:126-34
22. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; **149**:818-24
23. Okamoto K, Hamaguchi M, Kukita I, Kikuta K, Sato T. Efficacy of inhaled nitric oxide in children with ARDS. *Chest* 1998; **114**:827-33
24. Fioretto JR, Ferrari GF, Richetti SMQ, Moreira FL, Bonatto RC, Carpi MF. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo em Crianças: Incidência, Mortalidade e Trocas Gasosas. *Rev Bras Ter Intensiva* 2001; **2**:58-62
25. Tomashefski JF, Jr.: Patologia pulmonar na síndrome do desconforto respiratório do adulto, vol. 4: Interlivros; 1990

26. Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Kimura G, Kawanami O, Masugi Y. The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am J Pathol* 1987; **126**:171-82
27. Gattinoni L, Pesenti A, Bombino M, Baglioni S, Rivolta M, Rossi F, Rossi G, Fumagalli R, Marcolin R, Mascheroni D *et al.* Relationships between lung computed tomographic density, gas exchange, and PEEP in acute respiratory failure. *Anesthesiology* 1988; **69**:824-32
28. Gattinoni L, Presenti A. ARDS: The non-homogeneous lung: facts and hypothesis. *Crit Care Diagnosis* 1987; **6**:1-4
29. Gattinoni L, Pesenti A, Avalli L, Rossi F, Bombino M. Pressure-volume curve of total respiratory system in acute respiratory failure. Computed tomographic scan study. *Am Rev Respir Dis* 1987; **136**:730-6
30. Dreyfuss D, Soler P, Saumon G. Mechanical ventilation-induced pulmonary edema. Interaction with previous lung alterations. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **151**:1568-75
31. Hickling KG. Low volume ventilation with permissive hypercapnia in the Adult Respiratory Distress Syndrome. *Clin Intensive Care* 1992; **3**:67-78
32. Parker JC, Hernandez LA, Peevy KJ. Mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 1993; **21**:131-43
33. Slutsky AS. Mechanical ventilation. American College of Chest Physicians' Consensus Conference. *Chest* 1993; **104**:1833-59
34. Slutsky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest* 1999; **116**:9S-15S

35. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *Jama* 2000; **284**:43-4
36. John J, Idell S. Strategies for Optimizing Oxygenation in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Clinical Pulmonary Medicine* 2004; **11**:318-27
37. Carpi MF, Fioretto JR: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. São Paulo: Atheneu; 2007
38. Arnold JH, Hanson JH, Toro-Figuero LO, Gutierrez J, Berens RJ, Anglin DL. Prospective, randomized comparison of high-frequency oscillatory ventilation and conventional mechanical ventilation in pediatric respiratory failure. *Crit Care Med* 1994; **22**:1530-9
39. Chan KP, Stewart TE. Clinical use of high-frequency oscillatory ventilation in adult patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2005; **33**:S170-4
40. Lia Graciano A, Freid EB. High-frequency oscillatory ventilation in infants and children. *Curr Opin Anaesthesiol* 2002; **15**:161-6
41. Mehta S, Lapinsky SE, Hallett DC, Merker D, Groll RJ, Cooper AB, MacDonald RJ, Stewart TE. Prospective trial of high-frequency oscillation in adults with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2001; **29**:1360-9
42. Arnold JH. High-frequency ventilation in the pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med* 2000; **1**:93-9
43. Hemmila MR, Napolitano LM. Severe respiratory failure: advanced treatment options. *Crit Care Med* 2006; **34**:S278-90

44. Fioretto JR, Rebello CM. High-frequency oscillatory ventilation in pediatrics and neonatology. *Rev Bras Ter Intensiva* 2009; **21**:96-103
45. Lee CT, Fein AM, Lippmann M, Holtzman H, Kimbel P, Weinbaum G. Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory-distress syndrome. *N Engl J Med* 1981; **304**:192-6
46. McGuire WW, Spragg RG, Cohen AB, Cochrane CG. Studies on the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1982; **69**:543-53
47. Williams MD, Leigh JS, Chance B. Hydrogen peroxide in human breath and its probable role in spontaneous breath luminescence. *Ann NY Acad Sci* 1982; **386**:478-83
48. Williams MD, Chance B. Spontaneous chemiluminescence of human breath. Spectrum, lifetime, temporal distribution, and correlation with peroxide. *J Biol Chem* 1983; **258**:3628-31
49. Cochrane CG, Spragg RG, Revak SD, Cohen AB, McGuire WW. The presence of neutrophil elastase and evidence of oxidation activity in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1983; **127**:S25-7
50. Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, Ketai LH, Boxer LA, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1986; **1**:11-4
51. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull* 1999; **55**:49-75

52. Aldini G, Dalle-Donne I, Facino RM, Milzani A, Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med Res Rev* 2007; **27**:817-68
53. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004; **122**:339-52
54. Ferreira AL, Matsubara LS. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. *Rev Assoc Med Bras* 1997; **43**:61-8
55. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J* 2003; **17**:1195-214
56. Tonon E, Ronchi CF, Stefano LM, Gut AL, Ferreira AL, Reis RA, Fioretto JR. O estresse oxidativo como evento determinante na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. *J bras med* 2010; **98**:18-21
57. Bowler RP, Velsor LW, Duda B, Chan ED, Abraham E, Ware LB, Matthay MA, Day BJ. Pulmonary edema fluid antioxidants are depressed in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003; **31**:2309-15
58. Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med* 2000; **28**:143-9
59. Schmidt R, Luboeinski T, Markart P, Ruppert C, Daum C, Grimminger F, Seeger W, Gunther A. Alveolar antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* 2004; **24**:994-9
60. Sato K, Kadiiska MB, Ghio AJ, Corbett J, Fann YC, Holland SM, Thurman RG, Mason RP. In vivo lipid-derived free radical formation by NADPH oxidase in acute lung injury induced by lipopolysaccharide: a model for ARDS. *Faseb J* 2002; **16**:1713-20

61. Rotta AT, Gunnarsson B, Fuhrman BP, Hernan LJ, Steinhorn DM. Comparison of lung protective ventilation strategies in a rabbit model of acute lung injury. *Crit Care Med* 2001; **29**:2176-84
62. Viana ME, Sargentelli GA, Arruda AL, Wiryawan B, Rotta AT. [The impact of mechanical ventilation strategies that minimize atelectrauma in an experimental model of acute lung injury]. *J Pediatr (Rio J)* 2004; **80**:189-96
63. Meyer J, Cox PN, McKerlie C, Bienzle D. Protective strategies of high-frequency oscillatory ventilation in a rabbit model. *Pediatr Res* 2006; **60**:401-6
64. Jian MY, Koizumi T, Yokoyama T, Tsushima K, Kubo K. Comparison of acid-induced inflammatory responses in the rat lung during high frequency oscillatory and conventional mechanical ventilation. *Inflamm Res* 2010; **59**:931-37
65. Metnitz PG, Bartens C, Fischer M, Fridrich P, Steltzer H, Druml W. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1999; **25**:180-5
66. Soltan-Sharifi MS, Mojtahedzadeh M, Najafi A, Reza Khajavi M, Reza Rouini M, Moradi M, Mohammadirad A, Abdollahi M. Improvement by N-acetylcysteine of acute respiratory distress syndrome through increasing intracellular glutathione, and extracellular thiol molecules and anti-oxidant power: evidence for underlying toxicological mechanisms. *Hum Exp Toxicol* 2007; **26**:697-703
67. Ritter C, da Cunha AA, Echer IC, Andrades M, Reinke A, Lucchiari N, Rocha J, Streck EL, Menna-Barreto S, Moreira JC *et al*. Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat. *Crit Care Med* 2006; **34**:471-7

68. Kinniry P, Amrani Y, Vachani A, Solomides CC, Arguiri E, Workman A, Carter J, Christofidou-Solomidou M. Dietary flaxseed supplementation ameliorates inflammation and oxidative tissue damage in experimental models of acute lung injury in mice. *J Nutr* 2006; **136**:1545-51
69. Rocksén D, et al. Vitamin E reduces transendothelial migration of neutrophils and prevents lung injury in endotoxin-induced airway inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2003; **28**:199–207
70. Lee WL, Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury. *Curr Opin Crit Care* 2001; **7**:1-7
71. Chow CW, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; **29**:427-31
72. Kinkel SL, Santandiford T, Caldwell C: Cytokine-induced mechanisms of acute lung injury leading to ARDS, vol. 63. New York: Cambridge University Press; 1999
73. Carvalho MEP, Deheinzelin D, Carvalho CRR: Fisiopatologia da lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório agudo, vol. 51. São Paulo: Lemar – Livraria e Editora Marina; 1999
74. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letters* 1985; **187**:33-37
75. Cao G, Prior RL. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol* 1999; **299**:50-62

76. Aldini G, Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med* 2001; **31**:1043-50

II - A Tese (artigo publicado)

Ventilação oscilatória de alta frequência atenua a lesão pulmonar oxidativa em um modelo de lesão pulmonar aguda em coelhos

Running title: Estresse oxidativo na lesão pulmonar aguda

Carlos Fernando Ronchi^{1a, 2 *}; Ana Lucia dos Anjos Ferreira^{1a}; Fabio Joly Campos^{1b}; Cilmary Suemi Kurokawa^{1b}; Mario Ferreira Carpi^{1b}; Aurélio Marcos de Moraes^{1b}; Rossano Cesar Bonatto^{1b}; Julio Defaveri^{1c}; Kyung-Jin Yeum²; Jose Roberto Fioretto^{1b}.

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu;

^{1a}Departamento de Medicina Interna; ^{1b}Departamento de pediatria; ^{1c}Departamento de Patologia; ²Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University.

*Autor para correspondência: Carlos Fernando Ronchi, Jean Mayer USDA – Human Nutrition Research Center on Aging – Tufts University, 711 Washington Street 02111, Boston, MA, USA, Fone / Fax: (617) 556 3204 / 556 3344, ronchi.carlos@yahoo.com

Apoio Financeiro: FAPESP: 2008/08199-2; USDA: 1950-51000-065-08S

RESUMO

Ventilação mecânica (VM) pode induzir estresse oxidativo pulmonar, o qual desempenha papel importante na lesão pulmonar. Este estudo comparou a ventilação mecânica convencional proterora (VMC) e a ventilação oscilatória de alta frequência (VAF) quanto a oxigenação, estresse oxidativo pulmonar, inflamação e lesão pulmonar histopatológica em modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) em coelhos. Coelhos ($n = 30$) foram ventilados com FiO_2 1.0. A lesão pulmonar foi induzida por infusão traqueal de solução salina (30mL/kg, 38 °C). Os animais foram aleatoriamente distribuídos para compor os seguintes grupos: a) Controle [GC: volume corrente (VT) 6mL/kg, pressão expiratória final positiva (PEEP) 5cmH₂O, frequência respiratória (FR) 40 ipm], b) LPA + VMC [GVMC: VT 6ml / kg, PEEP 10cmH₂O, FR 40 ipm] e c) LPA + VAF [GVAF: pressão média de vias aéreas (Paw) 14 cmH₂O, FR 10Hz]. Estresse oxidativo pulmonar foi avaliado por meio da capacidade antioxidante total, a resposta inflamatória pelo número de leucócitos polimorfonucleares/lavado broncoalveolar/pulmão e o dano histológico pulmonar foi quantificado por um escore. Parâmetros ventilatórios e hemodinâmicos foram registrados a cada 30 minutos. Ambos os grupos com LPA apresentaram piora da oxigenação após a indução da lesão pulmonar. Depois de 4 horas de ventilação mecânica, GVAF mostrou melhor oxigenação (PaO_2 - GC: $465,9 \pm 30,5$ = GVAF: $399,1 \pm 98,2$ > GVMC: $232,7 \pm 104$ mmHg, $p < 0,05$) e menor resposta inflamatória (GVMC: $4,27 \pm 1,50$ > GVAF: $0,33 \pm 0,20$ = GC: $0,16 \pm 0,15$; polimorfonucleares/lavado broncoalveolar/pulmão, $p < 0,05$), menor escore de lesão histopatológica [GVMC: 5 (1-16) > GVAF: 1 (0-5) > GC: 0 (0-3); $p < 0,05$] e menor estresse oxidativo pulmonar comparado ao GVMC (GC: $59,4 \pm 4,52$ = GVAF: $69,0 \pm 4,99$ > GVMC: $47,6 \pm 2,58$ %proteção / g de proteína, $p < 0,05$). Este estudo

demonstrou que o tratamento com VAF melhorou a oxigenação, o processo inflamatório, reduziu o dano histopatológico e atenuou o estresse oxidativo pulmonar comparado à ventilação mecânica convencional proterora sob estas condições experimentais e considerando as limitações do estudo.

Palavras-chave: ventilação oscilatória de alta frequência, ventilação mecânica convencional, lesão pulmonar aguda, estresse oxidativo, antioxidantes.

Introdução

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é a manifestação mais grave da lesão pulmonar aguda (LPA)^{1,2} e está associada à alta taxa de mortalidade³⁻⁵. Apesar do melhor entendimento da fisiopatologia da SDRA, seu mecanismo ainda não está totalmente compreendido.

Existem evidências de que as espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenhem papel no processo inflamatório, danificando o endotélio vascular pulmonar⁶ e podem ser responsáveis pelo desenvolvimento e progressão da SDRA⁷. ROS são continuamente geradas pelo metabolismo fisiológico e por mediadores inflamatórios⁸. Maior geração de ROS e diminuição da capacidade antioxidante podem estar envolvidas na patogênese da SDRA⁹. Além disso, a doença caracteriza-se por processo inflamatório que rompe a barreira alvéolo-capilar com edema intersticial e alveolar^{10, 11}. Estes efeitos podem comprometer a viabilidade celular ou induzir uma variedade de respostas celulares por meio da geração de espécies reativas secundárias, levando à morte celular por necrose ou apoptose^{12, 13}.

O principal tratamento da SDRA é a ventilação mecânica (VM)⁴, a qual também pode determinar lesão pulmonar inflamatória. É reconhecido que a lesão alveolar induzida por inspiração de alto volume corrente (VT) ou alta pressão do ventilador mecânico e que repetidos ciclos de colapso alveolar e reexpansão (conhecido como atelectrauma) desempenhem papel importante na gênese da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica¹⁴⁻¹⁶. Com base nestes conceitos, a ventilação mecânica convencional protetora foi introduzida como uma nova abordagem para suporte ventilatório em pacientes com SDRA. Este método visa

proteção pulmonar, limitando o VT (6mL/kg) e proporcionando pressão expiratória final positiva (PEEP) adequada com pressão de platô $\leq 30\text{cmH}_2\text{O}$ ¹⁷.

A ventilação oscilatória de alta frequência (VAF) é método ventilatório bastante atraente¹⁸⁻²⁰, pois utiliza volume corrente menor (1-3mL/kg), bem abaixo do espaço morto anatômico, em frequência respiratória bem acima da respiração fisiológica normal (5-10Hz; 1 Hz = 60 irpm), evitando assim variação ampla da pressão alveolar e a sua distensão por altos volumes correntes, típicos da ventilação mecânica convencional (VMC). Na VAF, a pressão média das vias aéreas (Paw) é constante e aplicada para alcançar e manter o recrutamento alveolar, mesmo no final da expiração²¹⁻²⁴.

Atualmente não há nenhum estudo disponível comparando o efeito da VMC e da VAF sobre o estresse oxidativo pulmonar avaliado por meio da capacidade antioxidante total (TAP). O método da capacidade antioxidante total determina de uma maneira global a capacidade de defesa antioxidante e o estresse oxidativo, e pode detectar os antioxidantes biológicos presentes no compartimento hidrofílico e lipofílico celular e suas interações contra o estresse oxidativo²⁵. Este método foi validado para utilização no plasma por Beretta et al.¹² e posteriormente aplicado em tecidos biológicos por Ferreira et al.²⁶. É baseado na oxidação de análogo lipofílico (probe) denominado BODIPY [ác. 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-undecanóico] por meio de um gerador de radical lipoperoxil (LOO•) do compartimento lipofílico denominado MeO-AMVN [2,2'-azobis(4-methoxi-2,4-dimetil-valero-nitrilo)]. A oxidação do BODIPY origina um produto de fluorescência verde que pode ser detectado em contador de emissão de luz fluorescente¹².

O objetivo deste estudo foi comparar o tratamento com VAF e VMC na lesão pulmonar aguda quanto a oxigenação, estresse oxidativo pulmonar, inflamação e histopatologia.

Métodos

Planejamento, animais, e instrumentação

Estudo *in vivo* realizado com animais de laboratório de forma prospectiva e controlada. Trinta coelhos Norfolk machos brancos, pesando entre 2,0 e 3,0 kg, foram anestesiados com quetamina (50mg/kg intramuscular) e xilazina (4mg/kg por via intramuscular). Os animais foram pré-oxigenados durante a respiração espontânea por meio de cateter nasal com cinco litros de oxigênio por minuto. A anestesia foi mantida por infusão contínua de quetamina (10mg/kg/h). A paralisia muscular foi induzida pela administração intravenosa de brometo de pancurônio (0,2mg/kg) e mantida com doses de 0,1mg/Kg conforme necessidade para controle dos movimentos respiratórios.

Foi realizada traqueostomia para a introdução de um tubo traqueal (3.0-3.5mm de diâmetro interno; Portex, Hythe, UK) fixado na posição correta por fita umbilical. Imediatamente após a traqueostomia, foi iniciada a ventilação mecânica com um ventilador Galileo Gold (*Hamilton Medical AG, Suécia*) no modo pressão-regulada-volume-controlado com os seguintes parâmetros iniciais: $FiO_2 = 1,0$; $VT = 6\text{mL/kg}$; $PEEP = 5\text{cmH}_2\text{O}$; frequência respiratória = 40-50 respirações/min. Essas configurações foram mantidas por 15 minutos para a estabilização. Logo depois da traqueostomia, um cateter vascular foi inserido na artéria carótida comum (22 Gauge Jelco, Introcan® Safety™ - B-Braun, Melsungen, Alemanha), e um cateter de duplo lúmen (5Fr. - Arrow International Inc., Reading , Philadelphia-EUA) na veia cava

superior através da veia jugular. O cateter arterial foi utilizado para avaliar os gases sanguíneos e a pressão arterial utilizando um sistema de monitoramento (LogiCal® da Medex, Dublin, EUA) conectado a um monitor convencional fisiológico (Dixtal 2010, Manaus, Brasil). O cateter de duplo lúmen foi utilizado para infusão contínua de sedativos, fluidos de manutenção e uso de drogas vasoativas.

Durante o experimento, se a pressão arterial média atingisse níveis abaixo de 50mmHg, iniciava-se infusão intravenosa de noradrenalina (0,5-1µg/kg/min). A necessidade de suporte inotrópico foi avaliada por meio de um escore de drogas vasoativas²⁷. Fluidos de manutenção foram fornecidos por infusão contínua de solução salina 0,9% contendo dextrose 5% a 4 mL/kg/h. A temperatura corporal foi monitorada continuamente por sonda esofágica e mantida a 38°C - 39°C com cobertor de aquecimento elétrico. A saturação arterial de oxigênio foi monitorada continuamente por meio de um oxímetro de pulso.

Os coelhos foram tratados de acordo com as diretrizes do *National Institutes of Health* e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista (protocolo no. 600) e pelo Comitê de Ética Experimental do *Jean Mayer USDA – Human Nutrition Research Center on Aging – Tufts University*.

Indução de lesão pulmonar aguda

A lesão pulmonar foi induzida por lavagens pulmonares realizadas com alíquotas de 30mL/kg de solução salina 0,9% aquecida (38°C) como descrito anteriormente^{11, 15}. Após a estabilização, uma amostra de gasometria arterial foi obtida para verificar se os animais apresentavam hipoxemia (dois valores de $PaO_2 \leq 200$ mmHg com 15 minutos de intervalo). Após este período de estabilização, os

animais foram submetidos a duas manobras de recrutamento dinâmica mantidas durante 30 segundos com Paw de 30 cmH₂O a fim de promover o recrutamento alveolar e igualar o histórico de volume pulmonar dos animais²⁸.

Medida da complacência pulmonar

A complacência pulmonar estática foi medida automaticamente pelo ventilador mecânico Galileo Gold durante cada ciclo respiratório. Esta medida é realizada baseando-se em cada ciclo respiratório, sem a necessidade de padrões especiais de fluxo inspiratório e manobras de oclusões quando o animal e/ou paciente estiver relaxado^{29, 30}.

Grupos Experimentais

Animais (n = 30) foram divididos aleatoriamente em três grupos: a) Controle [GC, n = 10: VT 6mL/kg, PEEP 5cmH₂O, no ventilador mecânico Galileo Gold (*Hamilton Medical AG, Suécia*); b) LPA + VMC [GVMC, n = 10: VT 6mL/kg, PEEP 10cmH₂O, Pressão platô limitada a ≤ 30 cmH₂O no mesmo ventilador]; e c) LPA + VAF [GVAF, n = 10: Paw 12-14cmH₂O, FR 10Hz, tempo inspiratório de 33% e amplitude de pressão inicial de 20cmH₂O, no ventilador mecânico SensorMedics 3100A (*Viasys Healthcare, Yorba Linda, EUA*)]. Na VMC foi utilizado o modo pressão-regulada-volume-controlado e a frequência respiratória foi mantida em 40-50 respirações/min para garantir PaCO₂ alvo de 40 a 45 mmHg. A amplitude de pressão na VAF foi modificada para manter o mesmo nível PaCO₂. A FiO₂ foi mantida em 1,0 durante todo o experimento para todos os grupos.

Gasometria arterial foi obtida antes (basal), após a indução da lesão pulmonar aguda (lesão pulmonar) e, posteriormente, a cada 30 minutos até completar quatro

horas de observação. Os gases sanguíneos foram analisados por um aparelho de gasometria arterial ABL-3 (*Bayer, Rapid Lab, Khiron 865*).

Coleta do tecido

O tubo traqueal foi pinçado no nível de PEEP em uso e o tórax foi cuidadosamente aberto para observar sinais de pneumotórax, confirmar a colocação adequada dos cateteres e para coletar os tecidos. Os animais foram sangrados antes da remoção do pulmão. O coração e os pulmões foram removidos da cavidade torácica em bloco. O pulmão direito foi dissecado e armazenado para análise de estresse oxidativo em todos os grupos. Amostras de tecido para análise do estresse oxidativo foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a realização da análise. Em cada grupo o brônquio principal esquerdo de cinco coelhos foi canulado e o pulmão lavado com duas alíquotas 15mL/kg de salina 0,9%. Os pulmões esquerdos que não foram instrumentados para realização do lavado broncoalveolar foram coletados e utilizados para análise histopatológica.

Lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar foi coletado e o número total de células contadas em uma câmara de hemocítômetro. Células foram diferenciadas com *kit* de coloração Panotic (LABORCLIN, PR, Brasil) e a porcentagem de leucócitos polimorfonucleares foi avaliada.

Análise histopatológica

Os pulmões foram preenchidos com solução tamponada de formalina a 10% e a arquitetura alveolar preservada por infusão lenta de formalina a uma pressão

máxima de 30 cmH₂O. Depois de pelo menos 48 horas de fixação, os fragmentos foram embebidos em parafina e realizados cortes axiais dos pulmões que foram corados com hematoxilina e eosina e examinados por dois patologistas independentes e que desconheciam a quais grupos os fragmentos pertenciam. Dez campos microscópicos foram selecionados aleatoriamente para o exame de cada lâmina, totalizando 20 testes para cada animal. O dano histológico pulmonar foi quantificado por um escore composto de sete variáveis (inflamação alveolar e intersticial, hemorragia alveolar e intersticial, edema, atelectasia e necrose). A gravidade da lesão foi classificada para cada uma das sete variáveis da seguinte forma: sem lesão = 0, lesão em 25% do campo = 1, lesão em 50% do campo = 2, lesão em 75% do campo = 3, lesão difusa = 4. A pontuação máxima possível era de 28 e a mínima zero^{31, 32}.

Análise da capacidade antioxidante total no tecido pulmonar

A capacidade antioxidante total foi utilizada para medir o estresse oxidativo pulmonar nos animais de todos os grupos. A capacidade antioxidante total no tecido pulmonar dos coelhos foi quantificada por meio da comparação da área sob a curva relativa à cinética de oxidação da suspensão dos lipossomas de fosfatidilcolina utilizado como matriz de referência biológica. A capacidade antioxidante varia de 0% (sem proteção) a 100% (proteção total)¹². Lipossomas para o controle foram preparados como previamente validado e relatado por Ferreira et al.²⁶ em tecido animal. Uma porção dorsal do pulmão direito foi pesada (0,4 g), fragmentada, e homogeneizada por 20 segundos no gelo com 2 mL de solução tampão fosfatada (100mM, pH7.4) usando um homogenizador (IKA, Ultra-Turrax T8 homogeneizador, Wilmington, NC, EUA). Alíquotas do sobrenadante foram coletadas após

centrifugação do tecido pulmonar em uma centrífuga refrigerada (6000 Sorvall RT, Du Pont Co., Newtown, CT, EUA) a 800 g por 15 minutos e utilizada para a medida da capacidade antioxidante total (TAP). O TAP da amostra (sobrenadante) foi monitorado por meio do produto de oxidação de fluorescência verde do BODIPY 581/591 usando um aferidor (Wallac Victor X2, Perkin-Elmer, Boston, MA, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicata. O resultado do TAP foi corrigido pelo valor da proteína do sobrenadante a qual foi determinada utilizando um kit - BCA Protein Assay, conforme descrito por outros autores^{12, 33}.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o SigmaStat (versão 2.03; SPSS, Chicago, IL). Dados distribuídos de forma normal foram comparados entre os diferentes grupos de tratamento por meio da análise de variância com subsequentes comparações múltiplas entre pares por meio do teste de Student-Newman-Keuls e expressos como média $\pm$ SD. Dados que não apresentaram distribuição normal foram comparadas pelo teste de análise de variância de uma via Kruskal-Wallis com todas as comparações entre os pares pelo teste de Dunn e foram expressos como mediana (intervalo interquartilico). Comparações dentro dos grupos em momentos diferentes foram realizadas usando a análise de medidas repetidas de Friedman com comparações posteriores pelo Método de Dunnett. Tabelas de contingência de dados categóricos foram comparadas pelo teste exato de Fisher. Significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

Resultados

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao peso (GC: $2,65 \pm 0,24$ = GVMC: $2,41 \pm 0,28$ = GVAF: $2,59 \pm 0,16$ kg; $p > 0,05$) e número de lavagem pulmonar para induzir a LPA (GVMC: $8,1 \pm 2,72$ = GVAF: $7,2 \pm 2,53$, $p > 0,05$). A porcentagem de líquido recuperado após a lavagem pulmonar foi de 85% e 83,2% para os grupos VMC e VAF ($p > 0,05$), respectivamente.

Um animal do grupo controle morreu de hipotensão refratária, dois animais do grupo VMC morreram de pneumotórax e sangramento traqueal e um animal do grupo VAF foi perdido por hipotensão refratária. Estes animais não foram incluídos ou analisados.

Hemodinâmica, mecânica pulmonar e troca gasosa

Não houve diferença estatística na pressão arterial média entre os grupos. Os animais dos grupos LPA necessitaram de noradrenalina para manter a pressão arterial média acima de 50 mmHg. Ambos os grupos com LPA apresentaram maior escore de drogas vasoativas quando comparados com o GC [GC: 0 (0-25) < GVMC: 50 (0-70) = GVAF: 50 (0-50); $p < 0,05$].

Os grupos com LPA apresentaram piora significativa na ventilação e oxigenação após a indução da lesão pulmonar comparado ao momento basal, antes da lesão, e com o grupo controle. Houve aumento significativo da Paw e diminuição da complacência pulmonar após a indução de lesão pulmonar (Tabela 1), assim permanecendo até o final do experimento. A pressão média de vias aéreas e a complacência pulmonar são apresentadas nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 – Índices de oxigenação e ventilação, mecânica pulmonar e dados hemodinâmicos nos momentos basal e lesão pulmonar (média $\pm$ SD)

	GVMC (n=10)		GVAF (n=10)	
	Basal	Lesão Pulmonar	Basal	Lesão Pulmonar
PaO₂ (mmHg)	475 $\pm$ 77,0 [†]	79,9 $\pm$ 12,7 ^{†*}	466,3 $\pm$ 36,2 [†]	66,2 $\pm$ 34,2 ^{†*}
Índice de Oxigenação (cm H₂O/mm Hg)	1,81 $\pm$ 0,66 [†]	12,55 $\pm$ 2,05 ^{†*}	1,50 $\pm$ 0,15 [†]	17,8 $\pm$ 6,32 ^{†*}
Complacência pulmonar (mL/cmH₂O)	3,34 $\pm$ 0,22 [†]	1,41 $\pm$ 0,31 ^{†*}	3,92 $\pm$ 0,75 [†]	1,33 $\pm$ 0,22 ^{†*}
Pressão média nas vias aéreas (cmH₂O)	8,2 $\pm$ 1,78 [†]	10,0 $\pm$ 1,54 ^{†*}	7,0 $\pm$ 0,38 [†]	10,1 $\pm$ 0,70 ^{†*}
PaCO₂ (mmHg)	40 $\pm$ 4,8 [†]	50 $\pm$ 6,0 ^{†*}	40 $\pm$ 5,38 [†]	50 $\pm$ 4,87 ^{†*}
Pressão arterial média (mmHg)	75 $\pm$ 15,7 [†]	75 $\pm$ 18,0 [†]	68 $\pm$ 10,1 [†]	60 $\pm$ 5,5 [†]

n = animais; Basal = antes da lesão pulmonar; Lesão pulmonar = após indução da lesão pulmonar; GVMC = grupo ventilação mecânica convencional; GVAF = grupo ventilação de alta frequência. Índice de oxigenação = [(FiO₂ x pressão média nas vias aéreas)/PaO₂] x 100.

* $p < ,05$ comparando basal e lesão pulmonar para cada grupo. [†] $p > ,05$ comparando grupos em cada momento. One Way ANOVA (teste de Bonferroni).

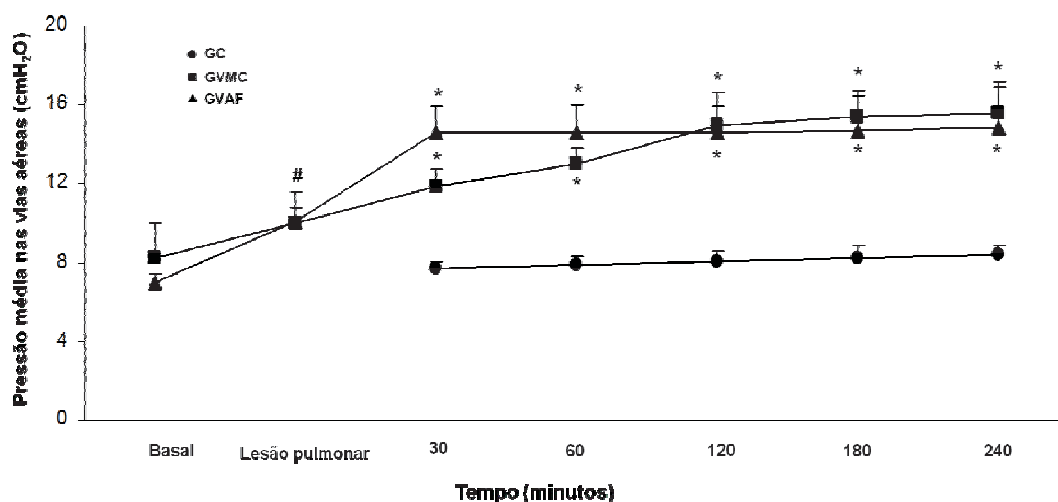


Figura 1 - Pressão média nas vias aéreas ao longo do tempo para os grupos experimentais. Os dados são apresentados como média $\pm$ SD. * $p < 0,05$ versus grupo controle (GC) e # $p < 0,05$ versus antes da lesão pulmonar. GC: Grupo controle; GVMC: grupo ventilação mecânica convencional; GVAF: grupo ventilação oscilatória de alta frequência.

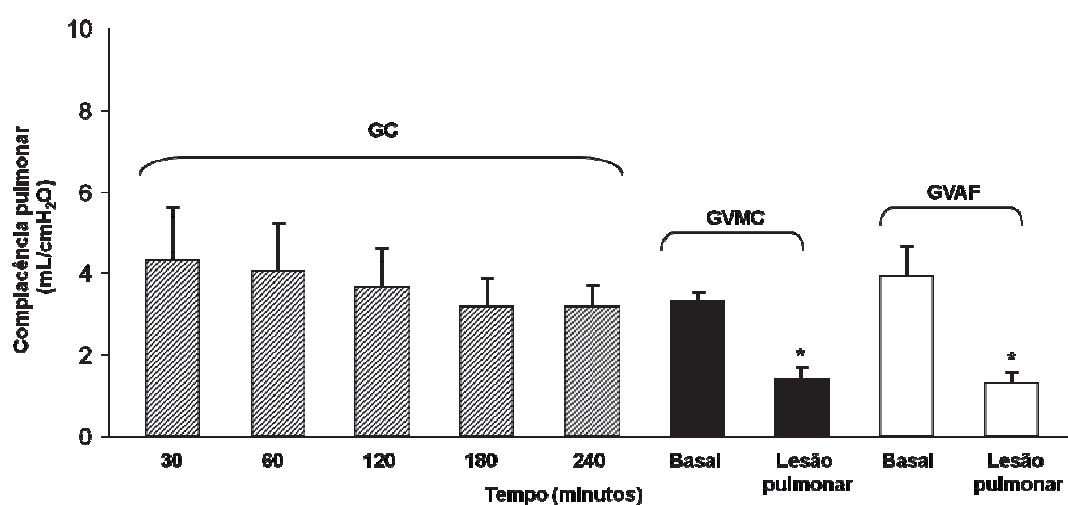


Figura 2 - Complacência pulmonar no grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica convencional (GVMC) e grupo ventilação de alta frequência (GVAF). Os dados são apresentados como média $\pm$ SD.

* $P < 0,05$ versus controle (GC) e antes da lesão pulmonar.

Após 4 horas de ventilação mecânica, o GVAF mostrou melhora significativa da oxigenação comparado com GVMC, apresentando índices de oxigenação semelhantes aos anteriores da lesão pulmonar e ao grupo controle. Valores de PaO_2 e índice de oxigenação são mostrados na Figura 3.

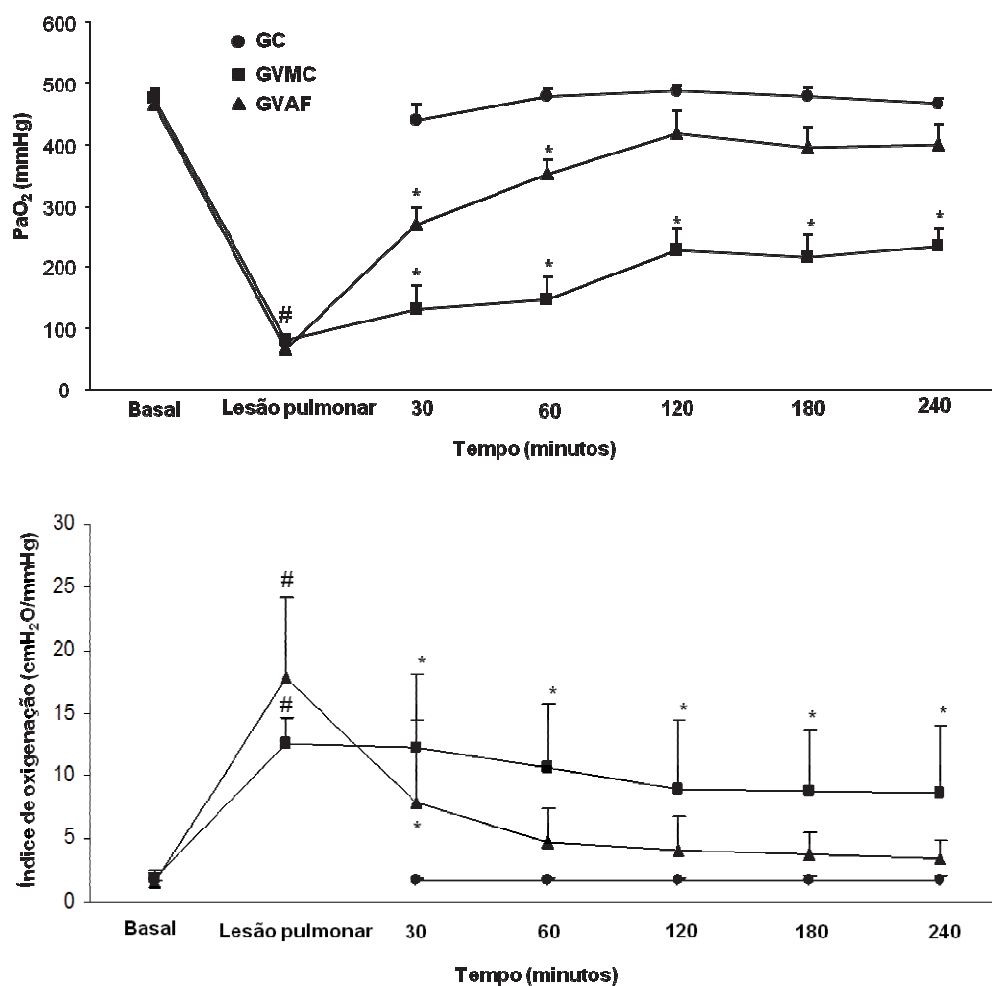


Figura 3 - PaO_2 ao longo do tempo para os grupos experimentais (painel A). Os dados são apresentados como média $\pm$ SD. * $P < 0,05$ vs grupo controle (GC) e # $p < 0,05$ vs antes da lesão pulmonar. Índice de oxigenação (pressão média das vias aéreas $\times$ $\text{FiO}_2 \times 100 / \text{PaO}_2$) ao longo do tempo para os grupos experimentais (painel B). Os dados são apresentados como média $\pm$ SD. * $P < 0,05$ vs grupo controle (GC) e # $p < 0,05$ vs antes da lesão pulmonar. GC: Grupo controle; GVMC: grupo ventilação mecânica convencional; GVAF: grupo ventilação oscilatória de alta frequência.

Lesão pulmonar oxidativa

A capacidade antioxidante total no tecido pulmonar do grupo com ventilação oscilatória de alta frequência foi semelhante ao grupo controle e significativamente maior do que o do GVMC (GC: $59,4 \pm 4,52$ = GVAF: $69,0 \pm 4,99$ > GVMC: $47,6 \pm 2,58$ porcentagem de proteção / g de proteína; $p < 0,05$) (Figura 4).

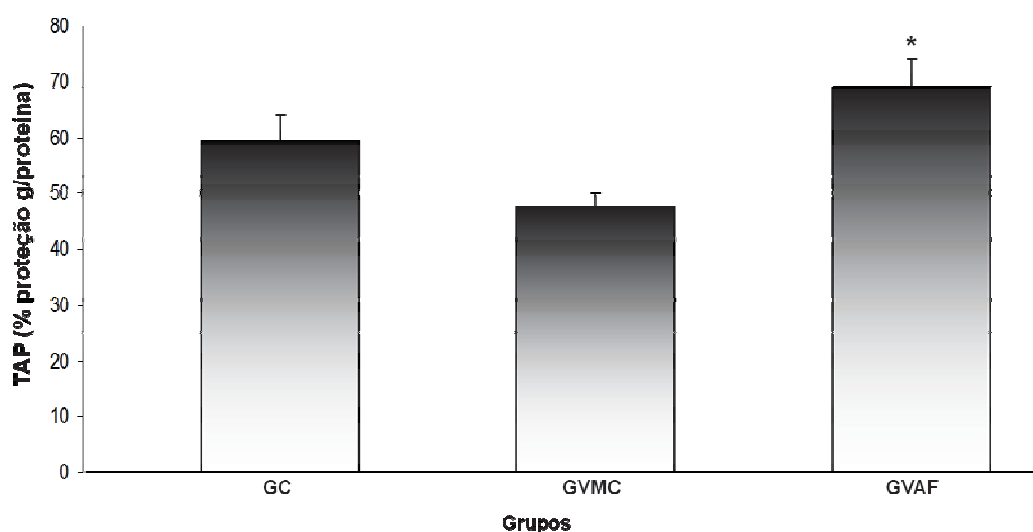


Figura 4 - Proteção pulmonar determinada pela capacidade antioxidante total (TAP) para os grupos experimentais. Os dados são apresentados como média $\pm$ SD. * $P < 0,05$ vs. grupo ventilação mecânica convencional protetora. GC: Grupo controle; GVMC: grupo ventilação mecânica convencional; GVAF: grupo ventilação oscilatória de alta frequência.

Lesão histopatológica

O grupo ventilação oscilatória de alta frequência apresentou escore de lesão histopatológica menor comparado com o GVMC (GVMC: 5 (2-16) > GVAF: 2 (0-5) > GC: 1 (0-2); $p < 0,05$) (Figura 5).

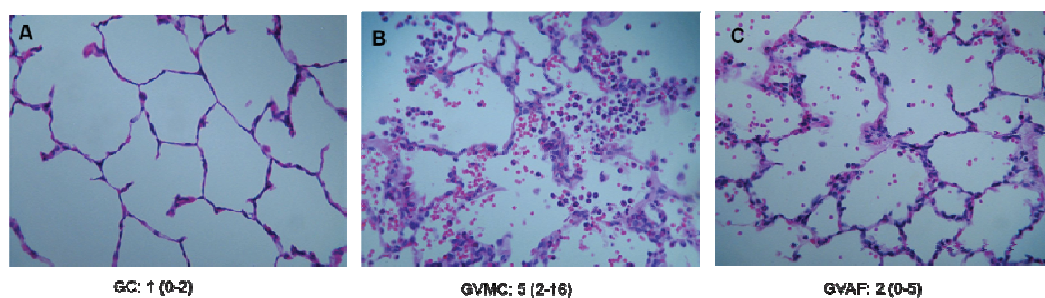


Figura 5 - Fotomicrografias microscopia óptica digital (200x, hematoxilina e eosina) de amostras representativas de áreas pulmonares dependentes do grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica convencional (GVMC) e grupo de ventilação de alta frequência (GVAF). Escore de lesão histopatológica: GVMC > GVAF > GC, $p < 0,05$. Os dados são apresentados como mediana (intervalo). ANOVA Kruskal-Wallis, com comparações subsequentes pelo teste de Dunn.

Contagem de células polimorfonucleares

A contagem de células polimorfonucleares no lavado broncoalveolar foi significativamente menor no GVAF comparado ao GVMC e semelhante ao GC (GVMC: $4,27 \pm 1,50$ > GVAF: $0,33 \pm 0,20$ = GC: $0,16 \pm 0,15$; número de células polimorfonucleares/lavado broncoalveolar por pulmão, $p < 0,05$) (Figura 6).

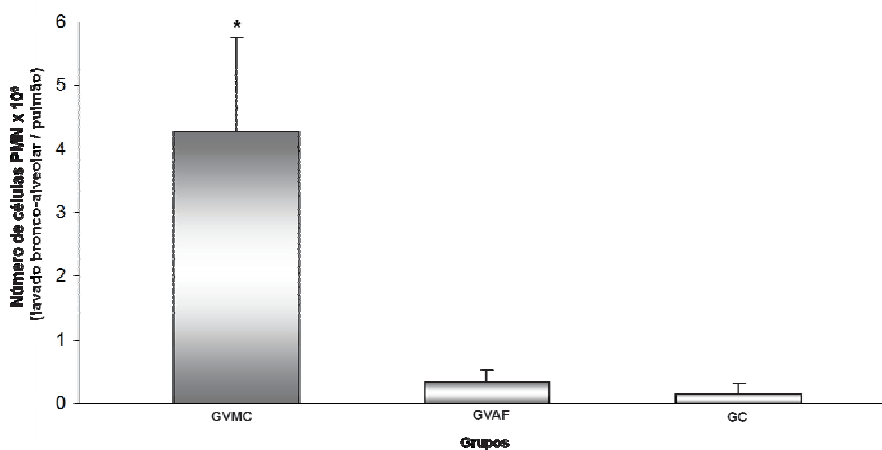


Figura 6 - Número de leucócitos polimorfonucleares (PMN) de células do lavado broncoalveolar no final do experimento do grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica convencional (GVMC) e grupo ventilação de alta frequência (GVAF): GVMC: $4,27 \pm 1,50$ > GVAF: $0,33 \pm 0,20$ = GC: $0,16 \pm 0,15$, $p < 0,05$. Os dados são apresentados como média $\pm$ SD. * $P < 0,05$ vs grupo controle (GC) e grupo ventilação oscilatória de alta frequência (GVAF).

Discussão

Os benefícios da ventilação mecânica utilizando menores volumes como estratégia de proteção pulmonar foram relatados em grande ensaio clínico randomizado multicêntrico¹⁷. Pacientes portadores de LPA ou SDRA ventilados com VT de 6mL/kg apresentaram redução significativa da mortalidade em comparação com aqueles ventilados com VT tradicional (10 – 12 mL/Kg). Este conceito levou ao aumento do interesse pela utilização da VAF²⁴ uma vez que esta modalidade usa VT muito baixo e Paw constante, com maior estabilidade alveolar. A hiperdistensão causada pela pressão aumentada nas vias aéreas em VMC pode ser evitada quando a VAF é utilizada, prevenindo o desrecrutamento alveolar e as oscilações no volume alveolar (colapso e reexpansão), poupando surfactante e diminuindo a inflamação local³⁴.

A ventilação oscilatória de alta frequência tem mostrado resultados benéficos consistentes no tratamento da SDRA em trabalhos clínicos e experimentais^{11, 15, 24, 35}. Em acordo com trabalhos anteriores, nosso estudo confirmou que a VAF melhorou a oxigenação e reduziu a lesão pulmonar inflamatória e histopatológica^{11, 15, 35-37}. Recentemente, Jian et al.³⁸ demonstraram redução da resposta inflamatória medida pela produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e infiltração de neutrófilos no lavado broncoalveolar em ratos com LPA. Nossos grupos com LPA apresentaram hipoxemia significativa após a lavagem pulmonar e rápida recuperação quando tratados com VAF. Resultados semelhantes foram observados por outros autores^{11, 17, 34, 39}.

Embora existam muitos estudos avaliando os efeitos da VAF sobre a oxigenação, inflamação e lesão histológica pulmonar em modelos animais de LPA, poucos têm analisado o estresse oxidativo pulmonar^{11, 18}. Além disso, até onde

podemos constatar, não há nenhum estudo disponível que tenha avaliado os efeitos da VAF sobre o estresse oxidativo pulmonar determinado pela capacidade antioxidante total (TAP). O método da TAP corresponde à forma única para determinar a capacidade antioxidante de um sistema biológico examinando ambos os compartimentos lipofílico e hidrofílico¹². O envolvimento do estresse oxidativo mediado por lesão tecidual é fator que provavelmente está envolvido na patogênese da SDRA⁴⁰. Quinlan et al.⁴¹ relataram que pacientes com SDRA apresentaram baixas concentrações de antioxidantes no plasma⁴¹. A ativação dos agregados de leucócitos na microvasculatura pulmonar causa a liberação de ROS, que podem lesar os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, iniciando, assim, um processo de peroxidação. A peroxidação leva à perda da integridade da membrana celular funcional, culminando em aumento agudo da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar. Na LPA, linfócitos ativados estimulam o fator de necrose tumoral (TNF) e outras citocinas e estas aumentam a geração de radicais livres por leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e outras células inflamatórias podendo resultar em SDRA⁴².

Rotta et al.¹¹, em modelo de LPA em coelhos semelhante àquele que empregamos, estudaram o estresse oxidativo por meio da análise do malondialdeído, um marcador inespecífico de peroxidação lipídica⁴³. Embora o grupo tratado com VAF tenha apresentado peroxidação lipídica menor do que o grupo tratado com VMC, este método de avaliação do estresse oxidativo tem sido criticado devido a sua baixa especificidade e sensibilidade^{44, 45}. Utilizando outro marcador de estresse oxidativo (mieloperoxidase), foi demonstrada redução do dano oxidativo pulmonar em modelo de LPA induzida por aspiração do suco gástrico em coelhos tratados com VAF¹⁸. Ainda que a mieloperoxidase seja associada ao dano

tecidual envolvendo células inflamatórias, isto implica somente na aferição da atividade oxidante de neutrófilos e de outras células que apresentam a atividade da mieloperoxidase ⁴⁶.

Em nosso estudo o grupo controle (ventilação mecânica sem lesão pulmonar) apresentou valores da TAP similares ao grupo tratado com VAF, sugerindo que a ventilação mecânica por si só leva ao estresse oxidativo pulmonar, provavelmente pelos ciclos repetidos de abertura e fechamento alveolar. De fato, estudos anteriores indicaram que a ventilação mecânica *per se* pode induzir lesão pulmonar muito semelhante à SDRA em humanos ^{47, 48}.

Como esperado, os animais submetidos ao tratamento com VMC e lesão pulmonar exibiram menor TAP do que os animais do grupo controle, indicando maior estresse oxidativo, provavelmente devido ao estiramento cíclico alveolar ou lesão pulmonar induzida pelo ventilador mecânico com a utilização de maiores volumes e pressões. Foi interessante notar que o grupo com lesão pulmonar tratado com VAF mostrou valor significativamente maior de TAP quando comparado ao grupo com lesão pulmonar tratado com VMC, sugerindo redução substancial do estresse oxidativo no tratamento com VAF. Estes resultados poderiam ser explicados pelas diferenças na lesão pulmonar induzida em modelos animais. Idealmente, os modelos animais deveriam reproduzir os mecanismos da LPA humana e suas consequências, incluindo as mudanças fisiológicas e patológicas. No entanto, nenhum modelo animal é capaz de reproduzir todas as características de LPA / SDRA em humanos ⁴⁷. Os coelhos, por exemplo, têm similaridade de 57% com a região hipervariável TLR4 em humanos, mas também estão associados com o dobro da produção de óxido nítrico em relação à LPA em humanos ⁴⁷.

Atualmente, um dos modelos de LPA mais comumente utilizado em animais é o de lavagem pulmonar com solução salina aquecida ⁴⁷. Este modelo causa primariamente a depleção de surfactante, o que provoca lesão pulmonar muito semelhante à SDRA humana em seus efeitos sobre a oxigenação, complacência do sistema respiratório, atelectasia e edema perivascular/peribrônquico. No entanto, induz menor infiltração de macrófagos e neutrófilos, a menos que outro estímulo, como a ventilação mecânica, seja adicionado ⁴⁷. Além disso, a remoção do surfactante pode interferir com a resposta inflamatória e imunológica pulmonar, assim como no metabolismo oxidativo, uma vez que o surfactante inibe a ativação respiratória de neutrófilos e exibe efeito antioxidante nos macrófagos alveolares ⁴⁹.

Baseado nos índices fisiopatológicos e bioquímicos analisados em nosso estudo foi possível observar que a VAF melhorou a oxigenação e reduziu o dano histopatológico. Portanto, podemos admitir a hipótese de que a VAF induziu menor estiramento alveolar limitando tanto a resposta inflamatória quanto o estresse oxidativo pulmonar.

Limitações do estudo e as implicações futuras: Primeiramente, não existe um único modelo animal que possa reproduzir todas as características de LPA / SDRA em seres humanos. Por outro lado, um dos modelos de LPA em animais mais utilizados é o de lavagem alveolar com soro fisiológico aquecido. Além disso, a FiO₂ de 1,0 durante quatro horas pode levar a danos do parênquima pulmonar e interferir com o metabolismo oxidativo. No entanto, foi utilizada a mesma concentração de oxigênio para todos os grupos, o que provavelmente excluiu qualquer grande variação entre os grupos devido à toxicidade de oxigênio. A remoção do surfactante, característica do modelo utilizado, pode interferir com a resposta inflamatória / imunológica pulmonar e metabolismo oxidativo porque o surfactante inibe a ativação

respiratória de neutrófilos e tem um efeito antioxidante em macrófagos alveolares ⁴⁹. Em segundo lugar, nós não permitimos alterações nos parâmetros ventilatórios (elevação dos níveis de PEEP acima de 10 cmH₂O), o que pode ter contribuído para hipóxia sustentada. No entanto, os coelhos submetidos à LPA são muito sensíveis à hipotensão, tornando difícil a utilização de níveis de PEEP mais altos como os empregados em pacientes com SDRA.

Apesar de resultados experimentais satisfatórios, não existem estudos clínicos com redução significativa da taxa de mortalidade em pacientes com SDRA submetidos à VAF. Seria muito difícil encontrar uma terapia única para tratamento da SDRA devido a sua complexidade fisiopatológica. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar o mecanismo do estresse oxidativo pulmonar na SDRA, utilizando diferentes estratégias ventilatórias e outras terapias adjuvantes, tais como posição prona, surfactante exógeno e óxido nítrico inalatório. A avaliação global dos antioxidantes e do estresse oxidativo pelo método do TAP em pacientes com SDRA pode fornecer informações úteis sobre as necessidades de suplementação com antioxidantes.

Conclusões

Considerando-se as limitações, o presente estudo demonstrou que a ventilação oscilatória de alta frequência desempenhou importante papel protetor na lesão pulmonar aguda, levando a melhora da oxigenação, processo inflamatório e redução do dano histopatológico, além de atenuar a lesão pulmonar oxidativa comparado à ventilação mecânica convencional protetora sob estas condições experimentais.

Agradecimentos

Apoiado em parte pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, São Paulo, SP, processo número: 2008/08199-2 e por uma concessão do Departamento de Agricultura dos EUA, USDA: 1950-51000-065-08S. Agradecemos a toda equipe do Laboratório Experimental do Departamento de Pediatria - UNESP e *Carotenoids & Health Lab* do *Human Nutrition Research Center on Aging - Tufts University* pela assistência e E. Colin Knaggs pela revisão do texto. Quaisquer opiniões, descobertas, conclusões, recomendações expressas nesta publicação são de responsabilidade do autor (s) e não refletem necessariamente a visão da UNESP ou Departamento de Agricultura dos EUA.

Referências Bibliográficas

1. Dernaika TA, Keddissi JI, Kinasewitz GT. Update on ARDS: beyond the low tidal volume. *Am J Med Sci* 2009; **337**:360-7
2. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; **2**:319-23
3. Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet* 2007; **369**:1553-64
4. Dahlem P, van Aalderen WM, Bos AP. Pediatric acute lung injury. *Paediatr Respir Rev* 2007; **8**:348-62
5. de Hemptinne Q, Rimmelink M, Brimiouille S, Salmon I, Vincent JL. ARDS: a clinicopathological confrontation. *Chest* 2009; **135**:944-49
6. 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
7. 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**:1738-44
8. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; **202**:145-56
9. Kietzmann D, Kahl R, Muller 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

10. Phua J, Stewart TE, Ferguson ND. Acute respiratory distress syndrome 40 years later: time to revisit its definition. *Crit Care Med* 2008; **36**:2912-21
11. Rotta AT, Gunnarsson B, Fuhrman BP, Hernan LJ, Steinhorn DM. Comparison of lung protective ventilation strategies in a rabbit model of acute lung injury. *Crit Care Med* 2001; **29**:2176-84
12. Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russell RM, Krinsky NI, Yeum KJ. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem* 2006; **354**:290-8
13. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; **52**:601-23
14. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; **342**:1334-49
15. Imai Y, Nakagawa S, Ito Y, Kawano T, Slutsky AS, Miyasaka K. Comparison of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation. *J Appl Physiol* 2001; **91**:1836-44
16. Gattinoni L, Protti A, Caironi P, Carlesso E. Ventilator-induced lung injury: the anatomical and physiological framework. *Crit Care Med* 2010; **38**:S539-48
17. Acute Respiratory Distress Syndrome network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; **342**:1301–08
18. Allardet-Servent J, Bregeon F, Delpierre S, Steinberg JG, Payan MJ, Ravailhe S, Papazian L. High-frequency percussive ventilation attenuates lung injury in a rabbit model of gastric juice aspiration. *Intensive Care Med* 2008; **34**:91-100
19. Turner DA, Arnold JH. Insights in pediatric ventilation: timing of intubation, ventilatory strategies, and weaning. *Curr Opin Crit Care* 2007; **13**:57-63

20. Girard TD, Bernard GR. Mechanical ventilation in ARDS: a state-of-the-art review. *Chest* 2007; **131**:921-9
21. Fioretto JR, Rebello CM. High-frequency oscillatory ventilation in pediatrics and neonatology. *Rev Bras Ter Intensiva* 2009; **21**:96-103
22. Peck MD, Koppelman T. Low-tidal-volume ventilation as a strategy to reduce ventilator-associated injury in ALI and ARDS. *J Burn Care Res* 2009; **30**:172-5
23. Chan KP, Stewart TE, Mehta S. High-frequency oscillatory ventilation for adult patients with ARDS. *Chest* 2007; **131**:1907-16
24. Meyer J, Cox PN, McKerlie C, Bienzle D. Protective strategies of high-frequency oscillatory ventilation in a rabbit model. *Pediatr Res* 2006; **60**:401-6
25. Yeum KJ, Beretta G, Krinsky NI, Russell RM, Aldini G. Synergistic interactions of antioxidant nutrients in a biological model system. *Nutrition* 2009; **25**:839-46
26. Ferreira AL, Yeum KJ, Matsubara LS, Matsubara BB, Correa CR, Pereira EJ, Russell RM, Krinsky NI, Tang G. Doxorubicin as an antioxidant: maintenance of myocardial levels of lycopene under doxorubicin treatment. *Free Radic Biol Med* 2007; **43**:740-51
27. Gaies MG, Gurney JG, Yen AH, Napoli ML, Gajarski RJ, Ohye RG, Charpie JR, Hirsch JC. Vasoactive-inotropic score as a predictor of morbidity and mortality in infants after cardiopulmonary bypass. *Pediatr Crit Care Med* 2010; **11**:234-38
28. McCulloch PR, Forkert PG, Froese AB. Lung volume maintenance prevents lung injury during high frequency oscillatory ventilation in surfactant-deficient rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1988; **137**:1185-92
29. Huang CC, Fu JY, Hu HC, Kao KC, Chen NH, Hsieh MJ, Tsai YH. Prediction of fluid responsiveness in acute respiratory distress syndrome patients ventilated with

low tidal volume and high positive end-expiratory pressure. *Crit Care Med* 2008; **36**:2810-6

30. GALILEO Operator's manual 610862/01 software version 3 HAMILTON MEDICAL, pp 6-25

31. Rotta AT, Gunnarsson B, Hernan LJ, Fuhrman BP, Steinhorn DM. Partial liquid ventilation influences pulmonary histopathology in an animal model of acute lung injury. *J Crit Care* 1999; **14**:84-92

32. Mrozek JD, Smith KM, Bing DR, Meyers PA, Simonton SC, Connett JE, Mammel MC. Exogenous surfactant and partial liquid ventilation: physiologic and pathologic effects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **156**:1058-65

33. Aldini G, Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med* 2001; **31**:1043-50

34. Piva J, Chatrkaw P, Choong K, Frndova H, Cox P. High frequency oscillation ventilation compared to conventional mechanical ventilation plus exogenous surfactant replacement in rabbits. *J Pediatr (Rio J)* 2000; **76**:349-56

35. Mehta S, Granton J, MacDonald RJ, Bowman D, Matte-Martyn A, Bachman T, Smith T, Stewart TE. High-frequency oscillatory ventilation in adults: the Toronto experience. *Chest* 2004; **126**:518-27

36. Sugiura M, McCulloch PR, Wren S, Dawson RH, Froese AB. Ventilator pattern influences neutrophil influx and activation in atelectasis-prone rabbit lung. *J Appl Physiol* 1994; **77**:1355-65

37. Hamilton PP, Onayemi A, Smyth JA, Gillan JE, Cutz E, Froese AB, Bryan AC. Comparison of conventional and high-frequency ventilation: oxygenation and lung pathology. *J Appl Physiol* 1983; **55**:131-8

38. Jian MY, Koizumi T, Yokoyama T, Tsushima K, Kubo K. Comparison of acid-induced inflammatory responses in the rat lung during high frequency oscillatory and conventional mechanical ventilation. *Inflamm Res* 2010; **59**:931-37
39. Derdak S, Mehta S, Stewart TE, Smith T, Rogers M, Buchman TG, Carlin B, Lowson S, Granton J. High-frequency oscillatory ventilation for acute respiratory distress syndrome in adults: a randomized, controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **166**:801-8
40. Grune T, Berger MM. Markers of oxidative stress in ICU clinical settings: present and future. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; **10**:712-7
41. Quinlan GJ, Evans TW, Gutteridge JM. Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res* 1994; **20**:289-98
42. 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**:111-20
43. Vahlquist A, Duvic M: Retinoids and carotenoids in dermatology. New York: Informa Healthcare USA; 2007
44. Winterbourn CC, Carr AC. Myeloperoxidase-dependent loss of malondialdehyde: a limitation for detecting neutrophil-mediated lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1993; **302**:461-7
45. Grotto D, Maria LS, Valentine J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Pomblum VJ, Rocha JB, Farina M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova* 2009; **32**:169-74

46. Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med* 2000; **28**:143-9
47. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; **295**:L379-99
48. Vlahakis NE, Hubmayr RD. Cellular stress failure in ventilator-injured lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **171**:1328-42
49. Mallory GB, Jr. Surfactant proteins: role in lung physiology and disease in early life. *Paediatr Respir Rev* 2001; **2**:151-8

Original Research

High-frequency oscillatory ventilation attenuates oxidative lung injury in a rabbit model of acute lung injury

Carlos Fernando Ronchi^{1,4}, Ana Lucia dos Anjos Ferreira¹, Fabio Joly Campos², Cilmerly Suemi Kurokawa², Mario Ferreira Carpi², Marcos Aurelio de Moraes², Rossano Cesar Bonatto², Julio Defaveri³, Kyung-Jin Yeum⁴ and Jose Roberto Fioretto²

¹Internal Medicine Department; ²Pediatrics Department; ³Pathology Department, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School, 18618-970 Botucatu, SP, Brazil; ⁴Jean Mayer USDA – Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University, Boston, MA 02111, USA

Corresponding author: Carlos Fernando Ronchi, Jean Mayer USDA – Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, 711 Washington Street, Boston, MA 02111, USA. Email: ronchi.carlos@yahoo.com

Abstract

Mechanical ventilation (MV) can induce lung oxidative stress, which plays an important role in pulmonary injury. This study compared protective conventional mechanical ventilation (CMV) and high-frequency oscillatory ventilation (HFOV) for oxygenation, oxidative stress, inflammatory and histopathological lung injury in a rabbit model of acute lung injury (ALI). Rabbits ($n = 30$) were ventilated at FiO_2 1.0. Lung injury was induced by tracheal saline infusion (30 mL/kg, 38°C). Animals were randomly assigned to: (a) sham control (CG: tidal volume [V_T] 6 mL/kg, positive end expiratory pressure [PEEP] 5 cmH₂O, respiratory rate [RR] 40 ipm); (b) ALI + CMV (CMVG: V_T 6 mL/kg, PEEP 10 cmH₂O, RR 40 ipm); or (c) ALI + HFOV (HFG: mean airway pressure [Paw] 14 cmH₂O, RR 10 Hz) groups. Lung oxidative stress was assessed by total antioxidant performance assay, inflammatory response by the number of polymorphonuclear leukocytes/bronchoalveolar lavage fluid/lung and pulmonary histological damage was quantified by a score. Ventilatory and hemodynamic parameters were recorded every 30 min. Both ALI groups showed worse oxygenation after lung injury induction. After four hours of ventilation, HFG showed better oxygenation (partial pressure of oxygen [PaO_2] – CG: 465.9 ± 30.5 = HFG: 399.1 ± 98.2 > CMVG: 232.7 ± 104 mmHg, $P < 0.05$) and inflammatory responses (CMVG: 4.27 ± 1.50 > HFG: 0.33 ± 0.20 = CG: 0.16 ± 0.15 ; polymorphonuclear cells/bronchoalveolar lavage fluid/lung, $P < 0.05$), less histopathological injury score (CMVG: 5 [1–16] > HFG: 1 [0–5] > CG: 0 [0–3]; $P < 0.05$), and lower lung oxidative stress than CMVG (CG: 59.4 ± 4.52 = HFG: 69.0 ± 4.99 > CMVG: $47.6 \pm 2.58\%$ protection/g protein, $P < 0.05$). This study showed that HFOV had an important protective role in ALI. It improved oxygenation, reduced inflammatory process and histopathological damage, and attenuated oxidative lung injury compared with protective CMV under these experimental conditions considering the study limitations.

Keywords: high-frequency oscillatory ventilation, conventional mechanical ventilation, acute lung injury, oxidative stress, antioxidants

Experimental Biology and Medicine 2011; 236: 1188–1196. DOI: 10.1258/ebm.2011.011085

Introduction

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is the most severe manifestation of acute lung injury (ALI)^{1,2} and is associated with high mortality rate.^{3–5} Despite better understanding of ARDS pathophysiology, its mechanism is still unclear.

Reactive oxygen species (ROS) are said to play an important role in pulmonary vascular endothelial inflammatory damage,⁶ which is thought to be responsible for the

development and progression of ARDS.⁷ ROS are continuously generated by the body's normal metabolism as well as inflammatory mediators.⁸ Increased ROS generation and decreased antioxidant capacity may be involved in ARDS pathogenesis.⁹ In addition, an inflammatory process disrupts the alveolar-capillary barrier with interstitial and alveolar edema.^{10,11} These effects can severely compromise cell viability or induce a variety of cellular responses through generation of secondary reactive species, ultimately leading to cell death by necrosis or apoptosis.^{12,13}

The main ARDS supportive treatment, mechanical ventilation (MV),⁴ may lead to inflammatory lung injury. It is generally accepted that alveolar stretch induced by either large inspired tidal volumes (V_T) or high ventilator pressures, and repeated alveolar collapse and re-expansion (known as atelectrauma) play an important role in the genesis of ventilation-induced lung injury.^{14–16} Based on these concepts, conventional protective ventilation has been introduced as a new approach to ventilatory support for ARDS patients. This method aims to protect the lung by limiting V_T (6 mL/kg) and providing adequate positive end expiratory pressure (PEEP) with plateau pressure ≤ 30 cmH₂O.¹⁷

High-frequency oscillatory ventilation (HFOV) is an attractive ventilatory method.^{18–20} It uses a lower V_T (1–3 mL/kg) with a frequency above normal physiological breathing (5–10 Hz), thus avoiding larger alveolar pressure and volume excursions, typical of conventional mechanical ventilation (CMV). In HFOV, a constant mean airway pressure (Paw) is applied to achieve and maintain alveolar recruitment even at end expiration.^{21–24}

Currently, there is no study available comparing the effect of HFOV and CMV on lung oxidative stress assessed by total antioxidant performance (TAP) assay. TAP assay determining overall antioxidant/oxidative stress can capture the biological antioxidant network between water- and fat-soluble antioxidants and their interactions²⁵ against oxidative stress. This method has been validated by Beretta et al.¹² and applied to tissues.²⁶ It is based on a lipophilic radical generator (MeO-AMVN) and a lipophilic oxidizable substrate (BODIPY) that specifically measures the lipid compartment oxidizability related to fat-soluble antioxidants as well as to water-soluble antioxidants acting through a synergistic/cooperative mechanism.¹²

The aim of the current study was to compare HFOV with CMV treatment in ALI for antioxidant performance, oxygenation, inflammation and histopathology. The effects of two different ventilatory strategies were determined in an experimental ALI model.

Methods

Design, animals and instrumentation

This was a prospective, randomized, sham-controlled and *in vivo* animal study. Thirty male Norfolk white rabbits, weighing 2.0–3.0 kg, were anesthetized with ketamine (50 mg/kg intramuscularly) and xylazine (4 mg/kg intramuscularly). Animals were preoxygenated during spontaneous breathing with 100% oxygen by nose catheter. Anesthesia was maintained with continuous intravenous infusion of ketamine (10 mg/kg/h) and xylazine (4 mg/kg/h). Muscle paralysis was induced by intravenous administration of pancuronium bromide (0.2 mg/kg) and maintained with 0.1 mg/kg doses as needed to control minimal respiratory movements and disproportional tachycardia.

A tracheotomy was performed by inserting a tracheal tube (3.0–3.5 mm internal diameter; Portex, Hythe, UK) and securing it in position with umbilical tape. Immediately after tracheotomy, ventilation was initiated

with a Galileo Gold ventilator (Hamilton Medical AG, Rhazuns, Sweden) in pressure-regulated-volume control mode with the following initial parameters: $FiO_2 = 1.0$; $V_T = 6$ mL/kg; PEEP = 5 cmH₂O; respiratory rate = 40–50 breaths/min. These settings were maintained for 15 min for stabilization. Once tracheotomy had been performed, a vascular catheter was inserted into the common carotid artery (22 Gauge Jelco, Introcan® Safety™; B-Braun, Melsungen, Germany), and a double lumen catheter (5^{Fr}; Arrow International Inc, Reading, PA, USA) was advanced into the superior vena cava through the jugular vein. The arterial catheter was used to assess blood gases and arterial blood pressures using a monitoring system (LogiCal® da Medex, Dublin, OH, USA) connected to a conventional physiological monitor (Dixtal 2010, Manaus, Brazil). The double lumen catheter was used for continuous infusion of sedatives, maintenance fluids and vasoactive drugs.

During the experiment, if mean arterial pressure fell below 50 mmHg, intravenous infusion of noradrenaline (0.5–1 µg/kg/min) was started. The need for inotropic support was measured by using a vasoactive-inotropic score.²⁷ Maintenance fluid was provided by a continuous infusion of 0.9% saline solution containing 5% dextrose at 4 mL/kg/h. Core temperature was monitored continuously by esophageal probe and body temperature was maintained at 38–39°C with electric warming pads. Continuous pulse oximetry was performed with the probe placed on a shaved portion of the rabbit's thigh.

Rabbits were cared for in accordance with the guidelines by the National Institutes of Health. This study was approved by the Experimental Research and Ethics Committee of Botucatu Medical School – Sao Paulo State University and Jean Mayer USDA – Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University.

Lung injury induction

Lung injury was induced by lung lavage with 30 mL/kg aliquots of 0.9% warm saline solution (38°C) as previously described.^{11,15} After stabilization, an arterial blood gas sample was obtained to verify that animals were hypoxemic (two values of partial pressure of oxygen [PaO_2] ≤ 200 mmHg 15 min apart). After this stabilization period, animals were subjected to two 30-s dynamic sustained inflations with Paw of 30 cmH₂O in order to promote lung recruitment and equalize volume history.²⁸

Measurement of respiratory system compliance

Static respiratory system compliance was measured automatically by a Galileo Gold ventilator (Hamilton Medical AG) breath by breath using a statistical technique called 'the least-square fit method'. This method is applied on a breath-by-breath basis, without the need for special inspiratory flow patterns and occlusions maneuvers when the animal and/or patient are relaxed.^{29,30}

Experimental groups

Animals ($n = 30$) were randomly assigned to three groups: (a) sham control (CG, $n = 10$: V_T 6 mL/kg, PEEP

5 cmH₂O, in the Galileo Gold ventilator [Hamilton Medical AG]); (b) ALI + CMV (CMVG, $n = 10$; V_T 6 mL/kg, PEEP 10 cmH₂O, Plato pressure limited to ≤ 30 cmH₂O in the same ventilator); or (c) ALI + HFOV (HFG, $n = 10$; Paw 12–14 cmH₂O, respiratory rate [RR] 10 Hz, inspiratory time of 33%, and initial pressure amplitude of 20 cmH₂O, in the SensorMedics 3100A ventilator [Viasys Healthcare, Yorba Linda, CA, USA]). In the CMV, pressure-regulated volume control mode, respiratory rate was maintained at 40–50 breaths/min to reach the targeted partial pressure of carbon dioxide (PaCO₂; 40–45 mmHg), as pressure amplitude in HFOV was modified to the same PaCO₂ level. FiO₂ was maintained at 1.0 throughout the experiment for all groups.

Arterial blood gas was obtained before (baseline) and after lung injury induction (lung injury), and every 30 min until completing four hours of observation, and was analyzed by an ABL-3 blood gas analyzer (Chiron RapidLab 865; Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, USA).

Tissue collection

The endotracheal tube was clamped at the PEEP level in use and the thorax was carefully opened to observe for signs of pneumothorax, to confirm proper catheter placement and to harvest tissue. Animals were exsanguinated before lung removal. The heart and lungs were removed *en bloc* from the thoracic cavity. The right lung in all groups was dissected and stored for oxidative stress analysis. Tissue specimens for oxidative stress study were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. In each group the left mainstream bronchus of five rabbits was cannulated and the left lung was lavaged with two 15 mL/kg aliquots of saline. Additionally, left lungs not instrumented for bronchoalveolar lavage were collected from five animals in each group and used for histopathological analysis.

Bronchoalveolar lavage

Bronchoalveolar lavage fluid was collected and total number of cells counted in a hemocytometer chamber. Cells were differentiated using a Panotic staining kit (Laborclin, Pinhais, Brazil) and the percentage of polymorphonuclear leukocytes was assessed.

Histopathological analysis

Lungs were filled with 10% buffered formalin and alveolar architecture preserved by slow gravity formalin drip at a maximum pressure of 30 cmH₂O. After at least a 48-h fixation, fragments were embedded in paraffin and axial lung sections made, stained with hematoxylin and eosin, and blindly examined by two independent pathologists. Ten microscopic fields were randomly selected for examination of each slide, totaling 20 tests for each animal. Pulmonary histological damage was quantified by a score using seven variables (alveolar and interstitial inflammation, alveolar and interstitial hemorrhage, edema, atelectasis and necrosis). Injury severity was graded for each of

the seven variables as follows: no injury = 0, injury to 25% of the field = 1, injury to 50% of the field = 2, injury to 75% of the field = 3, diffuse injury = 4. The maximum possible score was 28 and the lowest zero.^{31,32}

TAP analysis in lung tissue

TAP assay was used to measure oxidative stress status of rabbit lung from all groups. TAP in rabbit lung tissue was quantified by comparing the area under the curve relative to the oxidation kinetics of phosphatidylcholine liposome suspension used as the reference biological matrix. The antioxidant performance ranges from 0% (no protection) to 100% (total protection).¹² Liposomes for control were prepared as previously validated and reported by Ferreira *et al.*²⁶ in animal tissue. The dorsal portion of the right lung was weighed (0.4 g), minced and homogenized for 20 s on ice with 2 mL of phosphate buffer saline (100 mmol/L, pH 7.4) using an IKA Ultra-Turrax T8 homogenizer (Wilmington, NC, USA). Aliquots of supernatant were collected after centrifugation of lung tissue homogenate at 800g for 15 min in a Sorvall RT 6000 refrigerated centrifuge (Du Pont Co, Newtown, CT, USA) and used for TAP. Protein concentration was determined using BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay, as previously described.^{12,33}

Statistical analysis

Data were analyzed by SigmaStat (version 2.03; SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Normally distributed data were compared between the different treatment groups by one-way analysis of variance with all pairwise comparison procedures (Student-Newman-Keuls test) and expressed as mean $\pm$ SD. Data showing non-normal distribution were compared by Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks with all pairwise comparisons by Dunn's test and expressed as median (range). Intragroup comparisons at different time points were performed using Friedman's repeated measures analysis of variance on ranks with all pairwise multiple comparison procedures by Dunnett's method. Contingency tables of categorical data were compared by Fisher's exact test. Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

Results

There was no statistical difference between groups for weight (CG: 2.65 ± 0.24 = CMVG: 2.41 ± 0.28 = HFG: 2.59 ± 0.16 kg; $P > 0.05$) and number of lung lavages to induce ALI (CMVG: 8.1 ± 2.72 = HFG: 7.2 ± 2.53 ; $P > 0.05$). Percentages of fluid recovered from the lavaged lungs were 85% and 83.2% for CMV and HFOV groups ($P > 0.05$), respectively.

One animal from the sham control group (refractory hypotension), two from the CMV group (pneumothorax and tracheal bleeding) and one from the HFOV group (refractory hypotension) died. These animals were not included and analyzed.

Table 1 Oxygenation indexes, pulmonary mechanics and hemodynamic data at baseline and lung injury (mean $\pm$ SD)

	CMVG (n = 10)		HFG (n = 10)	
	Baseline	Lung injury	Baseline	Lung injury
PaO ₂ (mmHg)	475 $\pm$ 77.0 ^a	79.9 $\pm$ 12.7 ^{a*}	486.3 $\pm$ 36.2 ^a	66.2 $\pm$ 34.3 ^{a*}
Oxygenation index (cmH ₂ O/mmHg)	1.81 $\pm$ 0.66 ^a	12.65 $\pm$ 2.05 ^{a*}	1.50 $\pm$ 0.15 ^a	17.8 $\pm$ 6.32 ^{a*}
Respiratory system compliance (mL/cmH ₂ O)	3.34 $\pm$ 0.22 ^a	1.41 $\pm$ 0.31 ^{a*}	3.93 $\pm$ 0.75 ^a	1.33 $\pm$ 0.22 ^{a*}
Mean airway pressure (cmH ₂ O)	8.2 $\pm$ 1.78 ^a	10.0 $\pm$ 1.54 ^{a*}	7.0 $\pm$ 0.38 ^a	10.1 $\pm$ 0.70 ^{a*}
PaCO ₂ (mmHg)	40 $\pm$ 4.8 ^a	50 $\pm$ 6.0 ^a	40 $\pm$ 5.38 ^a	50 $\pm$ 4.87 ^a
Mean arterial pressure (mmHg)	75 $\pm$ 15.7 ^a	75 $\pm$ 18.0 ^a	68 $\pm$ 10.1 ^a	60 $\pm$ 5.5 ^a

PaO₂, partial pressure of oxygen; PaCO₂, partial pressure of carbon dioxide; n, animals; baseline, before lung injury induction; lung injury, right after lung injury induction; CMVG, conventional mechanical ventilation group; HFG, high-frequency oscillatory ventilation group. Oxygenation index = (FiO₂ $\times$ mean airway pressure)/PaO₂ $\times$ 100.

^aP < 0.05 comparing lung injury and baseline for each group.

^{*}P > 0.05 comparing groups in each moment. One-way repeated measures analysis of variance (Bonferroni test).

Hemodynamic, lung mechanics and gas exchange

There was no statistical difference in mean arterial pressure among groups. Animals from ALI groups required nor-adrenaline to maintain mean arterial pressure above 50 mmHg. Both injured groups were greater than sham control for vasoactive-inotropic score (CG: 0 [0–25] < CMVG: 50 [0–70] = HFG: 50 [0–50]; *P* < 0.05).

ALI groups showed significant hypoxemia and poorer ventilation after lung injury than baseline and the sham control group. There was significant increase in *Paw* and decrease in respiratory system compliance after lung injury induction (Table 1) lasting until the end of the experiment. Mean airway pressure and respiratory system compliance are shown in Figures 1 and 2, respectively.

After four hours of MV, the HFOV group showed a significant improvement in oxygenation over the CMV group, presenting oxygenation indexes similar to baseline and the sham control group. Values of PaO₂ and oxygenation index (oxygenation index: mean airway pressure $\times$ FiO₂ $\times$ 100/PaO₂; cmH₂O/mmHg) are shown in Figure 3.

Oxidative injury

TAP in lung tissue from the HFOV group was similar to the sham control group and significantly higher than the CMV group (CG: 59.4 $\pm$ 4.52 = HFG: 69.0 $\pm$ 4.99 > CMVG:

47.6 $\pm$ 2.58 percentage of protection/g protein; *P* < 0.05) (Figure 4).

Histopathology

The HFOV group showed a reduced histopathological injury score against the CMV group (CMVG: 5 (2–16) > HFG: 2 (0–5) > CG: 1 (0–2); *P* < 0.05) (Figure 5).

Polymorphonuclear counting

Recovered polymorphonuclear leukocytes cells from bronchoalveolar lavage fluid were lower in the HFOV group than in the CMV group and similar to the sham control group (CMVG: 4.27 $\pm$ 1.50 > HFG: 0.33 $\pm$ 0.20 = CG: 0.16 $\pm$ 0.15; number of polymorphonuclear leukocytes cells/bronchoalveolar lavage fluid per lung, *P* < 0.05) (Figure 6).

Discussion

The benefit of MV at lower *V_T* as a lung protective strategy has been reported in a large, multicenter, randomized, clinical trial.¹⁷ Patients with ALI or ARDS ventilated at 6 mL/kg *V_T* had a significant reduction in mortality compared with those ventilated at higher traditional *V_T*. This concept leads to an interest in HFOV³¹ as it uses a very small *V_T* and constant

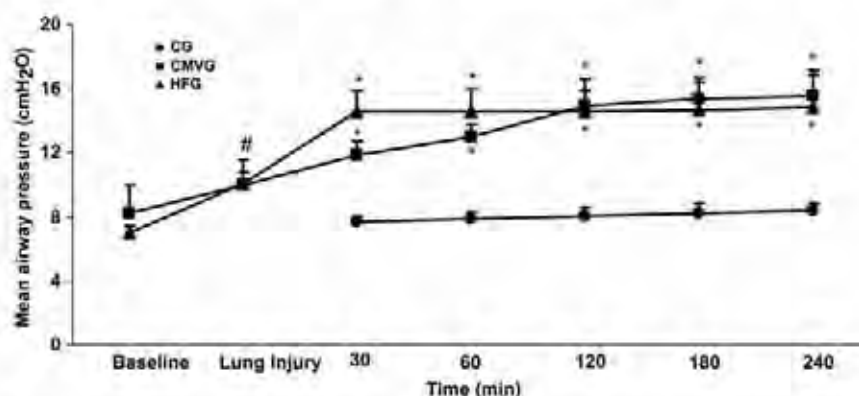


Figure 1 Mean airway pressure over time for the experimental groups. Data are shown as mean $\pm$ SD. [#]*P* < 0.05 versus sham control group (CG) and ^{*}*P* < 0.05 versus baseline. CMVG, conventional mechanical ventilation group; HFG, high-frequency oscillatory ventilation group.

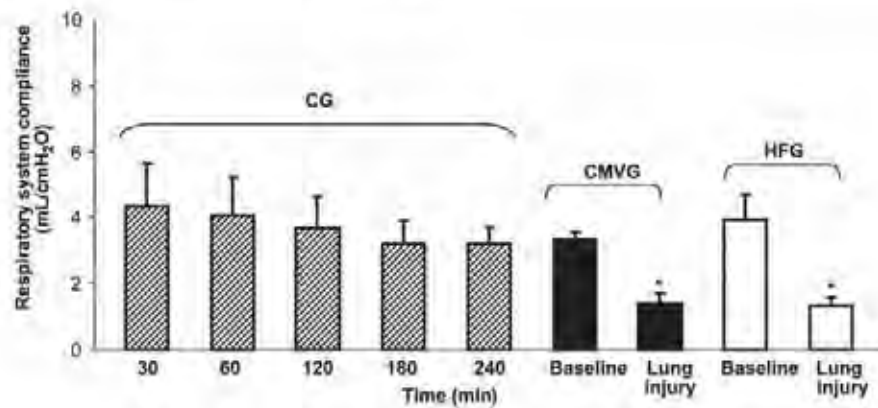


Figure 2 Respiratory system compliance on sham control group (CG), conventional mechanical ventilation group (CMVG) and high-frequency ventilation group (HFG). Data are shown as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ versus CG and baseline.

Paw with greater pulmonary stability. Overdistension caused by increased airway pressure in CMV can be avoided when HFOV is used, preventing alveolar derecruitment and oscillations in alveolar volume (collapse and re-expansion), saving surfactant and decreasing local inflammation.²⁴

HFOV has shown consistent beneficial results in clinical and experimental ARDS.^{11,15,24,35} In accordance with

previous reports, our study confirmed that HFOV improved oxygenation, and reduced inflammatory and histopathological injuries.^{31,15,25-27} Recently, Jian *et al.*³⁶ showed reduced inflammatory responses measured by tumor necrosis factor- α (TNF- α) production and neutrophil infiltration in bronchoalveolar lavage fluid in a rat model of ALI. Our ALI groups exhibited significant hypoxemia after

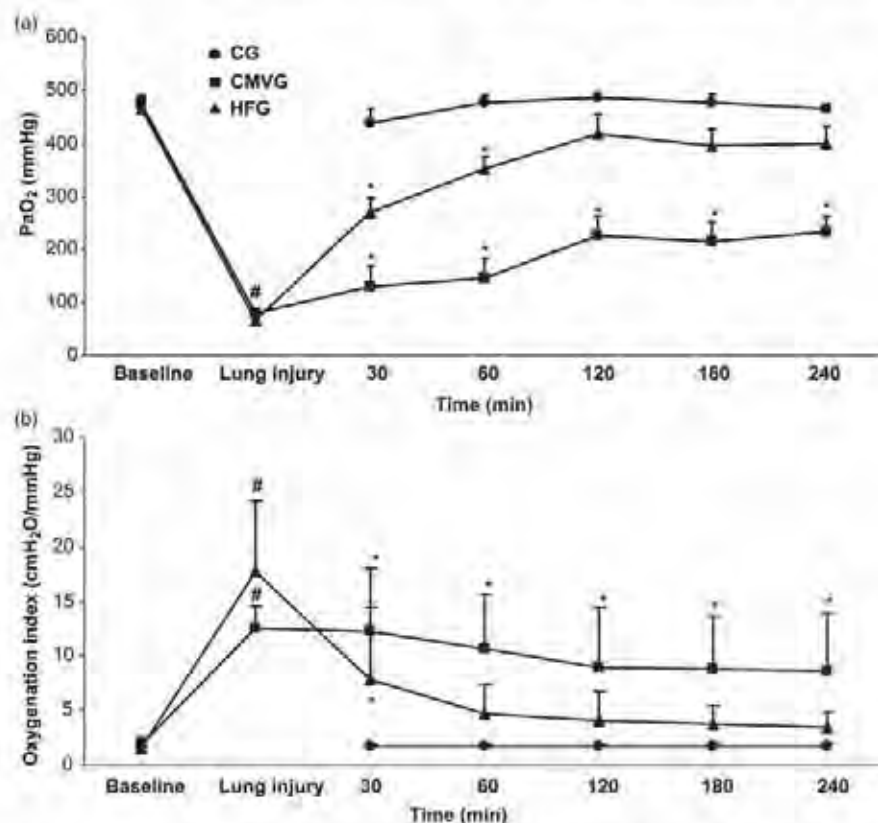


Figure 3 PaO₂ over time for the experimental groups (a). Data are shown as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ versus sham control group (CG) and # $P < 0.05$ versus baseline; oxygenation index (mean airway pressure $\times$ FIO₂ $\times$ 100/PaO₂) over time for the experimental groups (b). Data are shown as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ versus CG and # $P < 0.05$ versus baseline. PaO₂, partial pressure of oxygen; CMVG, conventional mechanical ventilation group; HFG, high-frequency oscillatory ventilation group.

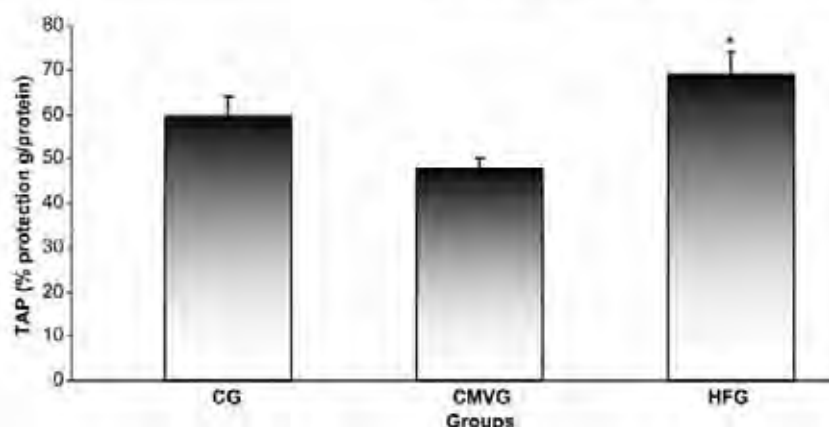


Figure 4 Lung protection by total antioxidant performance (TAP) assay for the experimental groups. Data are shown as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ versus protective conventional mechanical ventilation group. CG, sham control group; CMVG, conventional mechanical ventilation group; HFG, high-frequency oscillatory ventilation group.

lung lavage and prompt recovery by HFOV. Similar results have been observed by others.^{11,17,34,39}

While there are many studies evaluating the effects of HFOV on oxygenation, lung inflammation and histological injury in animal ALI models, only a few have analyzed oxidative stress.^{11,16} Furthermore, to our knowledge, there is no study available on the effects of HFOV on lung oxidative status determined by TAP assay in pulmonary tissue. The TAP assay is a unique method of determining the antioxidant capacity of both lipophilic and hydrophilic compartments of a biological system.¹² The involvement of oxidant-mediated tissue injury is likely to be an important event in ARDS pathogenesis⁴⁰ and ARDS patients are reported to have low plasma concentrations of antioxidants.⁴¹ Activated leukocyte aggregates in pulmonary microvasculature release ROS, which can attack membrane polyunsaturated fatty acid, thus initiating a peroxidation process. Peroxidation leads to the loss of cell membrane functional integrity, culminating in an acute increase of alveolar-capillary permeability. In ALI, activated lymphocytes stimulate TNF and other cytokines. These lymphokines augment free radical generation by polymorphonuclear leukocytes, macrophages and other cells, which may ultimately lead to ARDS.⁴²

Rotta *et al.*,⁴¹ in a similar model of ALI in rabbits, studied oxidative stress by measuring malondialdehyde, which is a non-specific biomarker of lipid peroxidation.⁴³ Although HFOV did show lower lipid peroxidation than CMV, this conventional assay has been criticized due to its low specificity and sensitivity.^{44,45} Using another oxidative stress marker (myeloperoxidase), authors showed reduced lung oxidative damage in HFOV in a rabbit model of gastric juice aspiration.¹⁸ Even though myeloperoxidase has been reportedly associated with tissue damage involving inflammatory cells, it only implicates oxidant activity of neutrophils and other myeloperoxidase-containing cells.⁴⁶

Control group (MV without lung injury) showed similar TAP values compared with HFG, suggesting that MV *per se* induced lung oxidative stress probably by repeated alveolar open/close cycles. Indeed, previous reports have stated that MV alone can induce lung injury very similar to human ARDS.^{47,48}

As expected, animals submitted to CMV and lung injury exhibited lower TAP than controls, indicating greater oxidative stress, probably due to the alveolar cyclic stretch or reduction in the mechanism of ventilator lung injury from exhalation to low volumes and pressures. It was interesting to note that HFOV with lung injury showed a significantly

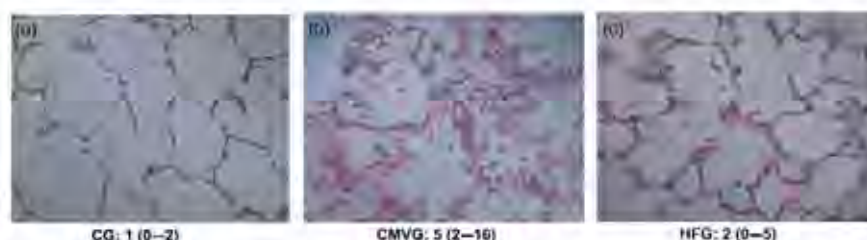


Figure 5 Optical microscopy digital photomicrographs ($\times 200$, hematoxylin and eosin) of representative samples of lung dependent areas from the sham control group (CG), conventional mechanical ventilation group (CMVG) and high-frequency ventilation group (HFG). Histopathological injury score: CMVG $>$ HFG $\approx$ CG, $P < 0.05$. Data are shown as median (range). Kruskal-Wallis analysis of variance, with subsequent comparisons by the Dunn test. (A color version of this figure is available in the online journal)

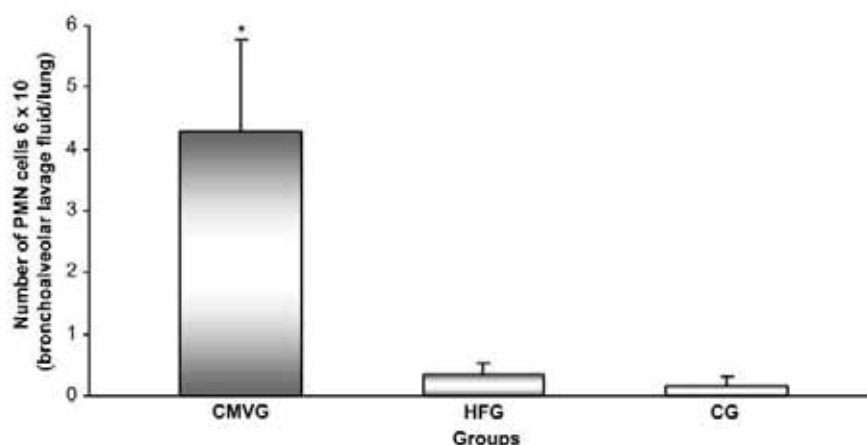


Figure 6 Number of polymorphonuclear leukocyte (PMN) cells recovered from bronchoalveolar lavage fluid at the end of experiment of the sham control group (CG), conventional mechanical ventilation group (CMVG) and high-frequency ventilation group (HFG): CMVG: 4.27 ± 1.50 > HFG: 0.33 ± 0.20 = CG: 0.16 ± 0.15 , $P < 0.05$. Data are shown as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ versus CG and HFG

higher TAP value than CMV with lung injury, suggesting a substantial reduction in oxidative stress with HFOV. These findings could be explained by the differences in the lung injury animal models. Ideally, animal ALI models should reproduce human ALI mechanisms and consequences, including physiological and pathological changes. However, no single animal model reproduces all the characteristics of ALI/ARDS in humans.⁴⁷ Rabbits, for instance, have a 57% similarity with the human TLR4 hypervariable region but are also associated with double the nitric oxide production of human ALI.⁴⁷

Currently, one of the most commonly used animal ALI models is alveolar lavage with warmed normal saline.⁴⁷ This is primarily a surfactant depletion model, which causes a lung injury very similar to human ARDS in its effects on oxygenation, respiratory system compliance, atelectasis and edema perivascular/peribronchial. However, it induces less macrophage and neutrophil infiltration, unless another injury such as MV is added.⁴⁷ Additionally, surfactant removal can interfere with lung inflammatory/immune response and oxidative metabolism, as surfactant inhibits respiratory activation of neutrophils and has an antioxidant effect on alveolar macrophages.⁴⁹

Based on the pathophysiological and biochemical indexes which we have analyzed, it is noted that HFOV improved oxygenation and reduced histopathological damage. Therefore, we can hypothesize that HFOV induced lower alveolar stretch limiting both lung inflammatory and oxidative stress response.

Study limitations and future implications

Firstly, no single animal model can reproduce all the characteristics of ALI/ARDS in humans. In addition, 1.0 FiO₂ during four hours may lead to lung parenchyma damage and interfere with oxidative metabolism. However, we used the same concentration of oxygen for all groups, which probably excluded any major variation among

groups due to oxygen toxicity. Surfactant removal, characteristic of the model used, can interfere with lung inflammatory/immune response and oxidative metabolism because surfactant inhibits neutrophil respiratory activation and has an antioxidant effect on alveolar macrophages.⁴⁹ Secondly, we did not allow changes in ventilator settings (raise PEEP levels above 10 cmH₂O) which may have contributed to sustained hypoxia. However, ALI rabbit models are all very sensitive to hypotension, making it difficult to use PEEP at the higher levels as used in ARDS patients.

Despite favorable experimental results, there are no clinical studies reporting significant reduction of mortality rate in ARDS patients submitted to HFOV. It would be very difficult to find a single therapy for ARDS management due to its pathophysiological complexity. Therefore, more studies are needed to evaluate the mechanisms of pulmonary tissue oxidative damage in ARDS using different ventilatory strategies and other adjuvant therapies, such as prone positioning, surfactant and inhaled nitric oxide. Evaluation of overall antioxidant/oxidative stress by TAP assay in patients with ARDS may provide useful information on antioxidant supplementation needs, which warrants further study.

Conclusions

The present study showed that HFOV had an important protective role in ALI. It improved oxygenation, reduced the inflammatory process and histopathological damage, and attenuated oxidative lung injury compared with protective CMV under these experimental conditions considering the study limitations.

Author contributions: CFR, MFC, JRF and ALAF contributed to the study design, data processing and drafting of the manuscript. FJC, CSK, RCB, JD and MAM participated in data acquisition. K-JY and JRF revised the manuscript critically and gave final approval of the version to be published.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, São Paulo, SP, Brazil (process number: 2008/08199-2) and by a grant from the US Department of Agriculture, Agricultural Research Service under Cooperative Agreement (USDA: 1950-51000-065-08S). We thank the Experimental Laboratory of Pediatrics Department - UNESP and Carotenoids & Health Laboratory at Human Nutrition Research Center on Aging - Tufts University staff for their assistance and Colin E Knaggs for text revision. Any opinions, findings, conclusion or recommendations expressed in this publication are those of the author(s) and do not necessarily reflect the view of the UNESP or US Department of Agriculture.

REFERENCES

- Dernaika TA, Keddissi JI, Kinawitz GT. Update on ARDS: beyond the low tidal volume. *Am J Med Sci* 2009;337:360-7
- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2:319-23
- Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet* 2007;369:1553-64
- Dahlem P, van Aalderen WM, Bos AP. Pediatric acute lung injury. *Pediatr Respir Rev* 2007;8:348-62
- de Hemptinne Q, Rimmelink M, Brimiouille S, Salmon I, Vincent JL. ARDS: a clinicopathological confrontation. *Chest* 2009;135:944-9
- 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
- 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;27:1738-44
- Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004;202:145-56
- Kietzmann D, Kahl R, Müller M, Burchard 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
- Phua J, Stewart TE, Ferguson ND. Acute respiratory distress syndrome 40 years later: time to revisit its definition. *Crit Care Med* 2008;36:2912-21
- Rotta AT, Gunnarsson B, Fuhrman BP, Hernan LJ, Steinhorn DM. Comparison of lung protective ventilation strategies in a rabbit model of acute lung injury. *Crit Care Med* 2001;29:2176-84
- Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russell RM, Krinsky NI, Yeum KJ. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem* 2006;354:290-8
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52:601-23
- Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1334-49
- Imai Y, Nakagawa S, Ito Y, Kawano T, Slutsky AS, Miyasaka K. Comparison of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation. *J Appl Physiol* 2001;91:1836-44
- Gattinoni L, Protti A, Caironi P, Carlesso E. Ventilator-induced lung injury: the anatomical and physiological framework. *Crit Care Med* 2010;38:S39-48
- Acute Respiratory Distress Syndrome network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1301-8
- Allardet-Servent J, Bregeon F, Delpierre S, Steinberg JG, Payan MJ, Ravaille S, Papazian L. High-frequency percussive ventilation attenuates lung injury in a rabbit model of gastric juice aspiration. *Intensive Care Med* 2008;34:91-100
- Turner DA, Arnold JH. Insights in pediatric ventilation: timing of intubation, ventilatory strategies, and weaning. *Curr Opin Crit Care* 2007;13:57-63
- Girard TD, Bernard GR. Mechanical ventilation in ARDS: a state-of-the-art review. *Chest* 2007;131:921-9
- Fioretto JR, Rebello CM. High-frequency oscillatory ventilation in pediatrics and neonatology. *Rev Bras Ter Intensiva* 2009;21:96-103
- Peck MD, Koppelman T. Low-tidal-volume ventilation as a strategy to reduce ventilator-associated injury in ALI and ARDS. *J Burn Care Res* 2009;30:172-5
- Chan KP, Stewart TE, Mehta S. High-frequency oscillatory ventilation for adult patients with ARDS. *Chest* 2007;131:1907-16
- Meyer J, Cox PN, McKelvie C, Bierle D. Protective strategies of high-frequency oscillatory ventilation in a rabbit model. *Pediatr Res* 2006;60:401-6
- Yeum KJ, Beretta G, Krinsky NI, Russell RM, Aldini G. Synergistic interactions of antioxidant nutrients in a biological model system. *Nutrition* 2009;25:839-46
- Ferreira AL, Yeum KJ, Matsubara LS, Matsubara BB, Correa CR, Pereira EJ, Russell RM, Krinsky NI, Tang G. Doxorubicin as an antioxidant: maintenance of myocardial levels of lycopene under doxorubicin treatment. *Free Radic Biol Med* 2007;43:740-51
- Gaies MG, Gurney JG, Yen AH, Napoli ML, Gajarski RJ, Ohye RG, Charpie JR, Hirsch JC. Vasoactive-inotropic score as a predictor of morbidity and mortality in infants after cardiopulmonary bypass. *Pediatr Crit Care Med* 2010;11:234-8
- McCulloch PR, Forkert PG, Froese AB. Lung volume maintenance prevents lung injury during high frequency oscillatory ventilation in surfactant-deficient rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1185-92
- Huang CC, Fu JY, Hu HC, Kao KC, Chen NH, Hsieh MJ, Tsai YH. Prediction of fluid responsiveness in acute respiratory distress syndrome patients ventilated with low tidal volume and high positive end-expiratory pressure. *Crit Care Med* 2008;36:2810-6
- GALILEO Operator's manual 610862/01 software version 3. Hamilton Medical, pp. 6-25
- Rotta AT, Gunnarsson B, Hernan LJ, Fuhrman BP, Steinhorn DM. Partial liquid ventilation influences pulmonary histopathology in an animal model of acute lung injury. *J Crit Care* 1999;14:84-92
- Mrozek JD, Smith KM, Bing DR, Meyers PA, Simonton SC, Connert JE, Mammel MC. Exogenous surfactant and partial liquid ventilation: physiologic and pathologic effects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1058-65
- Aldini G, Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1043-50
- Piva J, Chatkew P, Choong K, Frndova H, Cox P. High frequency oscillation ventilation compared to conventional mechanical ventilation plus exogenous surfactant replacement in rabbits. *J Pediatr (Rio J)* 2000;76:349-56
- Mehta S, Granton J, MacDonald RJ, Bowman D, Matte-Martyn A, Bachman T, Smith T, Stewart TE. High-frequency oscillatory ventilation in adults: the Toronto experience. *Chest* 2004;126:518-27
- Sugiura M, McCulloch PR, Wren S, Dawson RH, Froese AB. Ventilator pattern influences neutrophil influx and activation in atelectasis-prone rabbit lung. *J Appl Physiol* 1994;77:1355-65
- Hamilton PP, Onayemi A, Smyth JA, Gillan JE, Cutz E, Froese AB, Bryan AC. Comparison of conventional and high-frequency ventilation: oxygenation and lung pathology. *J Appl Physiol* 1983;55:131-8
- Jian MY, Koizumi T, Yokoyama T, Tsushima K, Kubo K. Comparison of acid-induced inflammatory responses in the rat lung during high frequency oscillatory and conventional mechanical ventilation. *Inflamm Res* 2010;59:931-37
- Derdak S, Mehta S, Stewart TE, Smith T, Rogers M, Buchman TG, Carlin B, Lowson S, Granton J. High-frequency oscillatory ventilation for acute respiratory distress syndrome in adults: a randomized, controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:801-8
- Grune T, Berger MM. Markers of oxidative stress in ICU clinical settings: present and future. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:712-7
- Quinlan GJ, Evans TW, Gutteridge JM. Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res* 1994;20:289-98

- 42 Kumar KV, Rao SM, Gayari R, Mohan IK, Naidu MU. Oxidant stress and essential fatty acids in patients with risk and established ARDS. *Clin Chim Acta* 2000;298:111-20
- 43 Vahlquist A, Duvic M. *Retinoids and Carotenoids in Dermatology*. New York: Informa Healthcare USA, 2007
- 44 Winterbourn CC, Carr AC. Myeloperoxidase-dependent loss of malondialdehyde: a limitation for detecting neutrophil-mediated lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1993;302:461-7
- 45 Grotto D, Maria LS, Valentine J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Pomblum VJ, Rocha JB, Farina M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova* 2009;32:169-74
- 46 Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med* 2000;28:143-9
- 47 Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:L379-99
- 48 Vlahakis NE, Hubmayr RD. Cellular stress failure in ventilator-injured lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1328-42
- 49 Mallory GB Jr. Surfactant proteins: role in lung physiology and disease in early life. *Paediatr Respir Rev* 2001;2:151-8

(Received March 14, 2011, Accepted June 23, 2011)

III – Desdobramentos da tese

Como desdobramento da tese outros dois grupos experimentais submetidos à ventilação mecânica convencional protetora e ventilação oscilatória de alta frequência foram acrescentados ao estudo, estes associados ao óxido nítrico inalatório, vasodilatador pulmonar que determina melhora da oxigenação. Também, após contato com a Profa. Dra Kyung-Jin Yeum surgiu a oportunidade de estágio no centro de pesquisa *Jean Meyer – Human Nutrition Research Center on Aging – Tufts University* com a colaboração da mesma para avaliação mais profunda de biomarcadores do estresse oxidativo e papel do óxido nítrico inalatório no tratamento da lesão pulmonar aguda. Com estes resultados foi possível a elaboração de mais dois manuscritos, um dos quais será apresentado a seguir.

1. Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury induced in rabbits submitted to different strategies of mechanical ventilation

Este manuscrito foi elaborado a partir da idéia de que a lesão oxidativa do DNA pode também estar envolvida, de forma importante, na fisiopatologia da lesão pulmonar aguda.

O teste do Cometa é comumente realizado para avaliação da lesão oxidativa de DNA utilizando células de linfócitos isolados como mostrado tanto por estudos clínicos como por modelos de experimentação animal. Este teste pode ser aplicado em qualquer tecido *in vivo* que forneça um núcleo de células. Embora linfócitos sejam utilizados com mais frequência em humanos e modelos experimentais para avaliar lesão de DNA pelo método do Cometa, este método pode ser aplicado em qualquer tecido, desde que uma suspensão de células possa ser obtida.

Para o nosso conhecimento, não há estudos que tenham aplicado o teste do cometa para avaliar a lesão oxidativa do DNA no tecido pulmonar em modelo de LPA e que o tenham correlacionado com outros marcadores de estresse oxidativo, como lesão oxidativa de DNA em células de sangue periférico.

A seguir apresentaremos o manuscrito completo que foi submetido ao “*Journal of Applied Physiology*” e está em fase de análise pelos revisores.

Dear Mr. Ronchi:

On 27th Oct 2011, I received your manuscript entitled "Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury induced in rabbits submitted to different strategies of mechanical ventilation" by authors Carlos Ronchi, Jose Fioretto, Ana Lucia Ferreira, Carolina Berchieri-Ronchi, Camila Correa, Cilmary Kurokawa, and Kyung-Jin Yeum.

Your manuscript has been assigned manuscript #: JAPPL-01334-2011.

Esther Barreiro will serve as the Associate Editor and direct the peer review of your manuscript.

Esther Barreiro will contact you as soon as this process is complete.

In the interim, you may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<http://jappl.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A2Dk6Rqf3A1BfrJ4F6A9Wt2ulzXJVLGKHxBZxAeaVgZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Thank you for submitting your best work to Journal of Applied Physiology.

Sincerely,

Peter D. Wagner, M.D.
Editor-in-Chief
Journal of Applied Physiology

Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury induced in rabbits submitted to different strategies of mechanical ventilation

Carlos Fernando Ronchi^{1,2a*}; Jose Roberto Fioretto^{2b}; Ana Lucia dos Anjos Ferreira^{2a}; Carolina Bragiola Berchieri-Ronchi^{1,2a}; Camila Renata Correa^{1,2a}; Cilmary Suemi Kurokawa^{2b}; Kyung-Jin Yeum¹.

Authors' contributions

CFR, JRF, ALAF and KJY contributed to the study design, data processing, and drafting of the manuscript. CRC, CSK, CBBR, and CFR participate in data acquisition.

¹Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University, Boston, MA, USA; ²Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School – Botucatu, SP, Brazil; ^{2a}Internal Medicine Department; ^{2b}Pediatrics Department.

Running title: Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury

***Corresponding author:** Carlos Fernando Ronchi, Jean Mayer USDA – Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, 711 Washington Street 02111, Boston, MA, USA, Phone: (617) 556-3204, FAX: (617)556-3344, E-mail address: ronchi.carlos@yahoo.com

Abstract

Oxidative damage has been said to play an important role in pulmonary injury, which is associated with the development and progression of acute respiratory distress syndrome (ARDS). We aimed to identify biomarkers to determine the oxidative stress in an animal model of acute lung injury (ALI) using two different strategies of mechanical ventilation. Rabbits were ventilated using either conventional mechanical ventilation (CMV) or high-frequency oscillatory ventilation (HFOV). Lung injury was induced by tracheal saline infusion (30mL/kg, 38°C). In addition, five healthy rabbits were studied for oxidative stress. Cells from peripheral blood and recovered from target tissue were analyzed by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay) to determine DNA damage. Total antioxidant performance (TAP) assay was applied to measure overall antioxidant performance in plasma and lung tissue. HFOV rabbits had similar results to healthy animals, showing significantly higher antioxidant performance and lower DNA damage compared to CMV in lung tissue and in plasma. TAP showed a significant positive correlation ($r=0.58$; $p=0.0006$) in plasma and lung tissue. In addition, comet assay presented a significant positive correlation ($r=0.66$; $p=0.007$) between cells recovered from target tissue and peripheral blood. Moreover, antioxidant performance was significantly and negatively correlated with DNA damage ($r= -0.50$; $p=0.002$) in lung tissue. This study indicates that both TAP and comet assay identify increased oxidative stress in CMV rabbits compared to HFOV. Antioxidant performance analyzed by TAP and oxidative DNA damage by comet assay, both in plasma, reflects oxidative stress in the target tissue, which warrants further studies in humans.

Key words: Comet assay, DNA damage, Antioxidant performance, Total antioxidant performance assay, Mechanical ventilation.

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) play an important role in pulmonary vascular endothelial inflammatory damage (1), which is thought to be responsible for the development and progression of acute respiratory distress syndrome (ARDS) (27). ROS are continuously generated by body's normal metabolism and inflammatory mediators (7). Also, it is known that increased ROS generation and decreased antioxidant performance may be involved in ARDS pathogenesis (23).

The main ARDS supportive treatment, mechanical ventilation (12), can lead to inflammatory lung injury due to large inspired tidal volumes or high ventilator inspiratory pressures, which is a typical drawback of conventional mechanical ventilation (CMV) (21, 43). On the other hand, high-frequency oscillatory ventilation (HFOV), which uses a lower tidal volume with a frequency above normal physiological breathing, avoiding larger alveolar pressure and volume excursions, is an attractive ventilatory method (3, 17, 41).

Total antioxidant performance (TAP) assay, determining overall antioxidant defense/oxidative stress, can capture the biological antioxidant network between water- and fat-soluble antioxidants and their interactions (47) against oxidative stress. This method has been validated by Beretta et al. (6) and applied to tissues (14, 15, 34). It is based on a lipophilic radical generator (MeO-AMVN) and a lipophilic oxidizable substrate (BODIPY) that specifically measures the lipid compartment oxidizability related to fat-soluble antioxidants, and to water-soluble antioxidants, acting through a synergistic/cooperative mechanism (6).

Single cell gel electrophoresis (SCGE), also known as comet assay, is commonly used in genetic toxicology and has become one of the standard methods for assessing DNA damage with applications in genotoxicity testing, human biomonitoring, molecular epidemiology, and ecotoxicology. It is fundamental in DNA damage and repair research (10, 11, 16, 22, 30, 32), including DNA double-strand breaks, single-strand breaks, alkali-labile sites, incomplete repair of a-basic sites and cross-links. Significant advantages of the comet assay over other genotoxicity tests include its fairly simple methodology, sensitivity, requirement for small number of cells, and rapid production of data (25, 39). Although lymphocytes are routinely used in human biomonitoring to assess DNA damage by comet assay (13), this assay can be applied to any tissue, provided that a single cell/nucleus suspension can be obtained (20).

To the best of our knowledge, no study is yet available evaluating overall antioxidant performance and oxidative stress determined by TAP and comet assay in an animal model of acute lung injury (ALI). Moreover, it is still not clear whether the oxidative damage in peripheral blood can reflects oxidative damage in target tissue. Such approach would be useful in clinical trials when target tissue is not possible to be accessed.

The objective of this study was to evaluate the oxidative stress/antioxidant performance comparing CMV with HFOV in an animal model of ALI. In addition, the correlation between oxidative stress/antioxidant performance in peripheral blood and target tissue was analyzed.

Materials and Methods

1. Chemicals

N-lauroyl sarcosinate, dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium chloride (NaCl), sodium hydroxide (NaOH), normal and low melting point agarose, Tris, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO); Triton X-100 and chlorohydric acid (HCl) from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ); Syber Green from Trevigen Inc. (Gaithersburg, MD); and trypan blue from Merck (Darmstadt, Germany).

2. Design, animals, and instrumentation

Thirty-two male Norfolk white rabbits, weighing 2.0–3.0kg, were anesthetized with ketamine (50mg/kg intramuscularly) and xylazine (2mg/kg intramuscularly). A tracheotomy was performed by inserting a tracheal tube (3.0–3.5mm internal diameter; Portex, Hythe, UK), secured in position with umbilical tape. Immediately after tracheotomy, ventilation was initiated with a Galileo Gold ventilator (Hamilton Medical AG, Sweden). In addition, five healthy rabbits were studied for oxidative stress.

Anesthesia was maintained with continuous intravenous infusion of ketamine (10mg/kg/h). Muscle paralysis was induced by intravenous administration of pancuronium bromide (0.2mg/kg) and maintained with 0.1mg/kg doses as needed to control movement.

Rabbits were cared for in accordance with the guidelines by the National Institute of Health. This study was approved by the Experimental Research and

Ethics Committee of Botucatu Medical School – Sao Paulo State University and Jean Mayer USDA-Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University.

3. Experimental Groups

Animals (n=37) were assigned to three groups: a) Healthy group [HG, n=5: without lung injury and mechanical ventilation; b) ALI+CMV group (CMV, n=16: V_T 6mL/kg, PEEP 10cmH₂O, Plato pressure limited to ≤ 30 cm H₂O in the Galileo Gold ventilator (Hamilton Medical AG, Sweden); and c) ALI+HFOV group [HFOV, n=16: Paw 12-14cmH₂O, RR 10Hz, inspiratory time of 33%, and initial pressure amplitude of 20cmH₂O, in the SensorMedics 3100A ventilator (Viasys Healthcare, Yorba Linda, USA)]. In the CMV, pressure-regulated volume control mode was used, respiratory rate was maintained at 40-50 breaths/min to reach targeted PaCO₂ (40-45 mmHg), as pressure amplitude in HFOV was modified to the same PaCO₂ level. FiO₂ was maintained at 1.0 throughout the experiment for all groups.

4. Lung Injury Induction

Lung injury was induced by lung lavage with 30mL/kg aliquots of 0.9% warm saline solution (38°C) as previously described (21, 36).

After lung injury induction animals were ventilated during 4 hours using the mechanical ventilators described above. This period of the experiment was chosen taking into consideration the viability of the rabbits submitted to this protocol (15, 21, 36).

5. Sample collection

Isolated lymphocytes and cells recovered from target tissue were analyzed by comet assay to determine DNA damage (% DNA in tail). Total antioxidant performance (TAP) assay was applied to measure overall antioxidant performance (% protection) in plasma as well as lung tissue.

5.1 – Lung tissue collection

Lung was dissected and stored for oxidative stress analysis. Tissue specimens were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

5.2 – Lymphocytes isolation, cryopreservation and recovery

Lymphocytes were immediately isolated after the blood collection. Isolation was performed by density gradient sedimentation (Histopaque 1077, Sigma Diagnostics) and frozen in a mixture containing 50% fetal bovine serum, 40% culture medium (RPMI 1640, Sigma Diagnostics), and 10% dimethyl sulfoxide at a freezing rate of -1°C / min to a final temperature of -80°C before stored in liquid nitrogen (48). Cells were recovered by submersion in a 37 °C water bath. Cells were placed in a pre chilled 50% RPMI 1640 medium combined with 50% fetal bovine serum, then centrifuged at $200 \times g$ for 5 min at 4 °C. Cells were resuspended in 250 µL of cold phosphate buffered saline and checked for viability (typically $\geq 95\%$ viability) and cell number (typically 1×10^5 cells/mL).

5.3 – Lung tissue preparation for comet assay

Techniques previously described (29, 37) with minor modifications were followed. Briefly, frozen lung tissue (200mg) was carefully minced and homogenized in 2 mL of cold PBS (20 μ M-EDTA) using a Potter homogenizer (Wheaton instruments, New Jersey, USA) for cells preparation. Suspension of cells was collected and left on ice for 10 min, then centrifuged at 200 X g for 5 min at 4 °C. Cells were resuspended in 250 μ L of cold phosphate buffered saline and checked for viability (typically $\geq$ 95% viability) and cell number (typically 1×10^5 cells/mL).

6. Single-cell gel electrophoresis analysis (comet assay)

DNA strand breaks were measured in cells obtained from lung tissue and peripheral blood using comet assay as proposed by Singh et al. (38), Tice et al. (40) and Collins et al. (11), with some modifications. Volumes of 20 μ L of cells obtained from lung tissue homogenate or peripheral blood were added to 150 μ L of 0.5% low melting point agarose at 37 °C. From the mixtures, 130 μ L were layered onto slides precoated with 1.5% normal agarose, covered with a coverslip, and left for 5 min at 4 °C to solidify the agarose. Subsequently, the coverslips were carefully removed and the slides immersed in a lysis solution for 24 h. Then, slides were washed with PBS for 5 minutes and immersed in a freshly prepared alkaline buffer (1mM EDTA, 300mM NaOH [pH> 13]) in a horizontal electrophoresis tray. After 40 min DNA unwinding period, electrophoresis was conducted at 25 V and 300mA for 30 min, followed by 15 min neutralization with 0.4M Tris buffer (pH 7.5). Slides were washed in absolute ethanol and stored at room temperature for drying. The gel on each slide was stained with 50 μ l SYBRgreen (Trevigen, Gaithersburg, MD) and diluted 1:10,000 in Tris-EDTA buffer. Slides were examined using a fluorescent microscope

at 400x magnification (8). Every step was carried out under indirect light. Slides were coded and analyzed without knowledge of the identity of the sample. DNA damage was measured by percentage of DNA in tail using computer scoring system (comet assay IV Software, Perceptive Instruments, Haverhill, Suffolk, UK).

7. Total antioxidant performance analysis

Total antioxidant performance assay was used to measure oxidative stress/antioxidant performance of rabbit lung tissue and peripheral blood. TAP was quantified by comparing the area under the curve relative to the oxidation kinetics of phosphatidylcholine liposome control suspension used as the reference biological matrix (Figure 1). The antioxidant performance ranges from 0% (no protection) to 100% (total protection) (6). Liposomes for control were prepared as previously validated and reported by Beretta et al. (6) in plasma and by Ferreira et al. (14, 15, 34) in animal tissue.

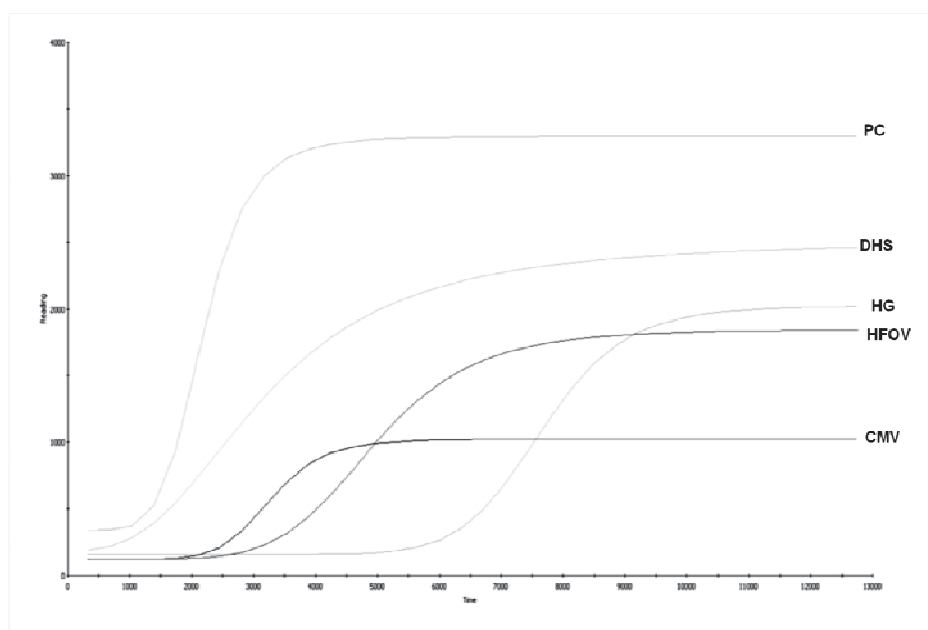


Figure 1 – Oxidation kinetics of phosphatidylcholine liposome control suspension used as the reference biological matrix. PC – phosphatidylcholine, DHS - Delipidized Human Serum, HG: Healthy group; CMV: Conventional mechanical ventilation group; HFOV: High-frequency oscillatory group.

Dorsal portion of right lung was weighed (0.4g), minced, and homogenized for 20s on ice with 2mL of phosphate buffer saline (100mM, pH7.4) using an IKA, Ultra-Turrax T8 homogenizer (Wilmington, NC). Aliquots of supernatant were collected after lung tissue homogenate centrifugation at 800 *g* for 15 min in a Sorvall RT 6000 refrigerated centrifuge (Du Pont Co., Newtown, CT) and used for TAP. Protein concentration was determined using BCA Protein Assay, as previously described (2, 6, 15).

Plasma total antioxidant performance (TAP) was determined fluorometrically with a 1420-multilabel counter (Wallac Victor 2; Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) as described previously (6).

8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SigmaPlot 11 (Systat Software, Inc. San Jose, CA). Data were compared between the different treatment groups by one-way analysis of variance with all pairwise comparison procedures (Student-Newman-Keuls test) and results expressed as mean $\pm$ SD. The correlation was performed using Pearson correlation. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

Results

Oxygenation and lung mechanics

Both injured groups showed similar decrease in oxygenation and deterioration of pulmonary mechanics after lung injury induction, as shown in figures 2.

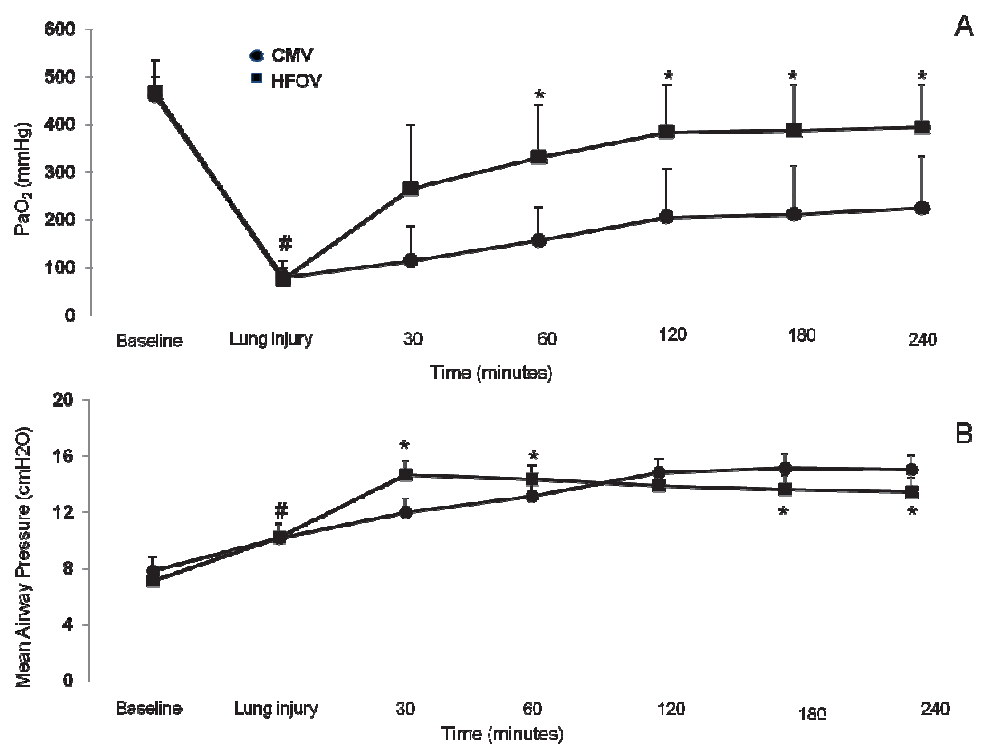


Figure 2 – PaO₂ over time for the experimental groups. Data are shown as mean $\pm$ SD. * $p < .05$ vs. conventional mechanical ventilation (CMV) and [#] $p < .05$ vs. baseline (Panel A). Mean Airway Pressure over time for the experimental groups. Data are shown as mean $\pm$ SD. * $p < .05$ vs. conventional mechanical ventilation (CMV) and [#] $p < .05$ vs. baseline (Panel B). CMV: Conventional mechanical ventilation group; HFOV: High-frequency oscillatory ventilation group.

Total antioxidant performance

Total antioxidant performance in plasma and lung tissue of the rabbits ventilated with HFOV showed similar antioxidant defense to those of healthy group and significantly higher as compared to those ventilated with CMV, as shown in Figure 3. In addition, a strong positive correlation ($r = 0.58$; $p = 0.0006$) between overall antioxidant defense in plasma and lung tissue were observed (Figure 4).

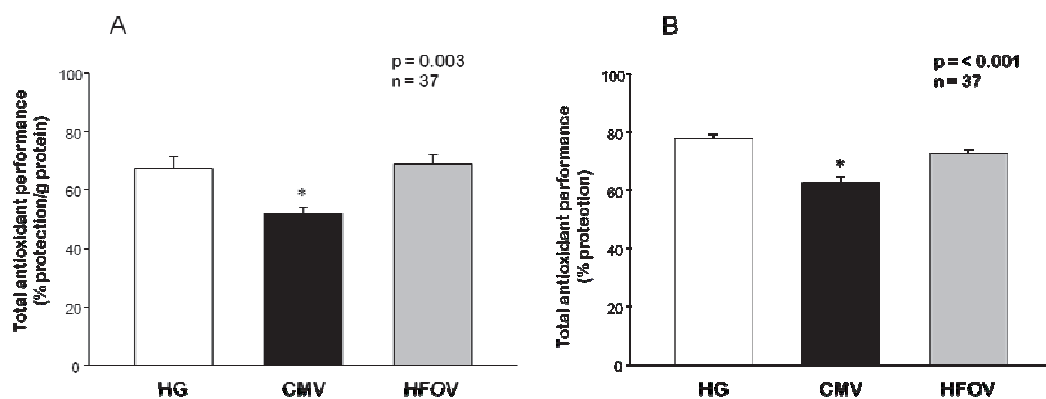


Figure 3 – Total antioxidant performance (TAP) in lung tissue (panel A) and plasma (panel B). Data are shown as mean $\pm$ SD. * $p < .05$ vs. HG and HFOV. HG: Healthy group; CMV: Conventional mechanical ventilation group; HFOV: High-frequency oscillatory group, n = number of animals.

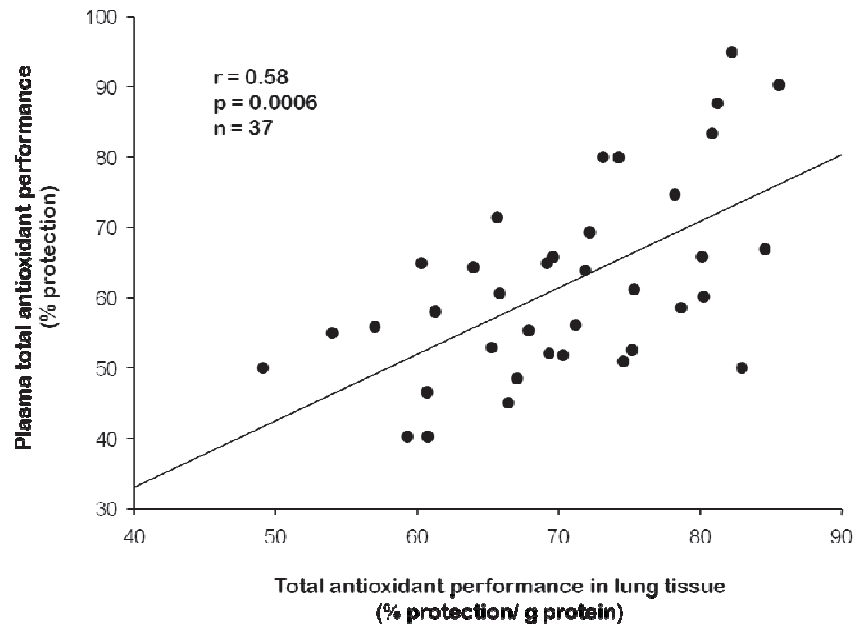


Figure 4 – Correlation between total antioxidant performance in plasma and lung tissue (Pearson Correlation). n= number of animals, r= correlation coefficient.

DNA damage analysis

Endogenous DNA damage assessed by comet assay was significantly lower in rabbits ventilated with HFOV compared to those of CMV (Figure 5).

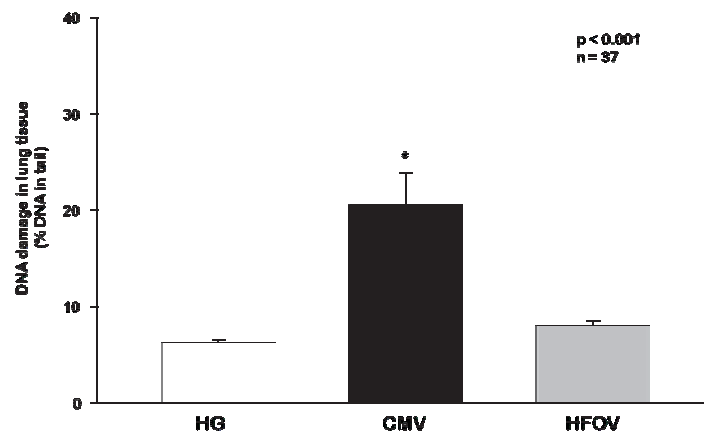


Figure 5 – Endogenous DNA damage (% DNA in tail) in lung tissue. Data are shown as mean $\pm$ SD. * $p < .05$ vs. HG and HFOV. HG: Healthy group; CMV: Conventional mechanical ventilation group; HFOV: High-frequency oscillatory group, n = number of animals.

In addition, a highly statistically significant correlation ($r = 0.66$; $p = 0.007$) was also observed between DNA damage in cells recovered from target tissue and isolated lymphocytes (Figure 6). Moreover, high antioxidant performance was significantly associated with the lower DNA damage ($r = -0.50$; $p = 0.002$) in lung tissue (Figure 7).

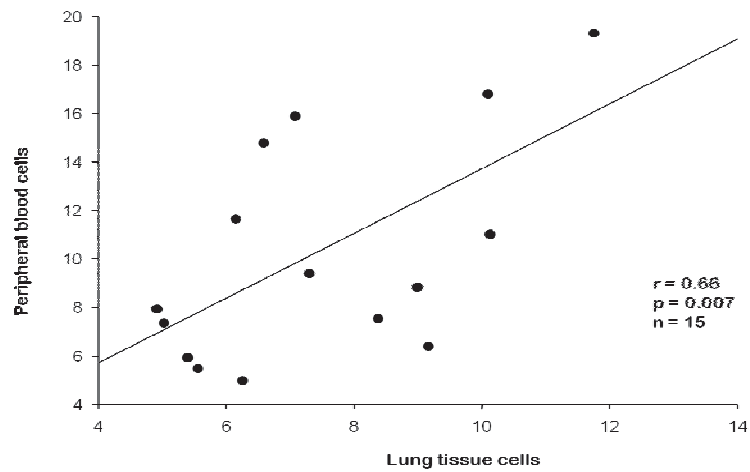


Figure 6 – Correlation between cells recovered from lung tissue and isolated lymphocytes in DNA damage analysis by comet assay (Pearson Correlation). n= number of animals, r= correlation coefficient.

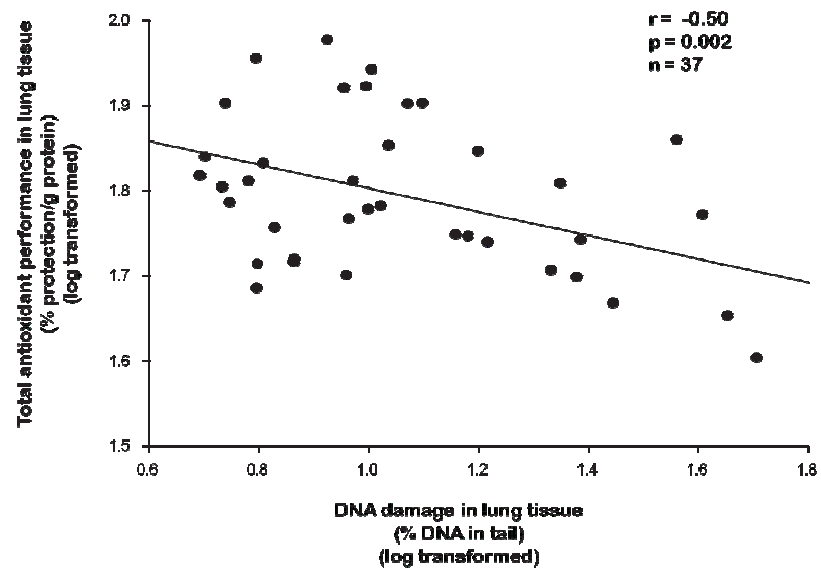


Figure 7 – Correlation between total antioxidant performance assay and DNA damage in lung tissue (Pearson Correlation). n= number of animals, r= correlation coefficient.

Discussion

Two different methods to measure antioxidant defense/oxidative stress were studied in this rabbit model of ALI treated with HFOV and CMV.

Firstly, we have analyzed overall antioxidant defense by TAP assay, which is a unique method of determining the antioxidant performance of both lipophilic and hydrophilic compartments of a biological system (6). The involvement of oxidant-mediated tissue injury is likely to be an important event in ARDS pathogenesis (19) and ARDS patients are reported to have low plasma concentrations of antioxidants (33). Activated leukocyte aggregates in pulmonary microvasculature and releases ROS, which can attack membrane polyunsaturated fatty acid, thus initiating a peroxidation process. Peroxidation leads to loss of cell membrane functional integrity, culminating in an acute increase of alveolar-capillary permeability. In ALI, activated lymphocytes stimulate tumor necrosis factor and other cytokines. These lymphokines augment free radical generation by polymorphonuclear leukocytes, macrophages, and other cells, which may ultimately lead to ARDS (24). Secondly, we have evaluated oxidative DNA damage by comet assay. This assay is a highly sensitive method to distinguish different types of DNA fragmentation caused by genotoxic compounds (31) and can be applied to any tissue *in vivo* model (20). The use of freshly isolated or cryopreserved lymphocytes to determine DNA damage using comet assay has been well established (10, 13, 26, 48). However, the use of target tissue to evaluate DNA damage by comet assay in animal models remains unclear and has not been correlated with peripheral blood cells.

In clinical practice, the early use of HOFV has shown beneficial effects on oxygenation, being an effective rescue therapy in ARDS patients not responding to CMV (28). However, while there are many studies evaluating the effects of

mechanical ventilation on oxygenation, lung inflammation, and histological injury in animal models of ALI, only a few have analyzed oxidative stress (3, 36). Rotta et al. (36) in a similar model of ALI in rabbits, studied oxidative stress by measuring malondialdehyde, which is a nonspecific biomarker of lipid peroxidation (42). Although HFOV did show lower lipid peroxidation than CMV, this conventional assay has been criticized due to its low specificity and sensitivity (18, 46). Using another oxidative stress marker (myeloperoxidase), authors showed reduced lung oxidative damage in HFOV in a rabbit model of gastric juice aspiration (3). Even though myeloperoxidase has been reportedly associated with tissue damage involving inflammatory cells, it only implicates oxidant activity of neutrophils and other myeloperoxidase-containing cells (45). Our group, in a recently experimental study (34), found that HFOV showed better oxygenation, reduced inflammatory and histopathological injury, and lower oxidative stress (evaluated by TAP) compared to CMV using this model of ALI.

To our knowledge, there is no study available correlating overall antioxidant defense and oxidative stress in peripheral blood and target tissue in animal model of ALI.

To analyze oxidative DNA damage using comet assay, a single-cell suspension can be obtained from solid tissue by tissue mincing and a second digestive step by incubation with proteolytic enzymes such as collagenase or trypsin (9), mincing briefly with a pair of fine scissors (40) or by pushing the tissue sample through a mesh membrane (20). Cell nuclei can be obtained by homogenization (29, 37). During mincing or homogenization, EDTA can be added to the processing solution to chelate calcium/magnesium and prevent endonuclease activation, and radical scavengers (e.g. DMSO) can be added to prevent oxidant-induced DNA

damage. Any cell dissociation method is acceptable as long as it can be demonstrated that the process is not associated with inappropriate background levels of DNA damage (20).

In the current study, the homogenization technique with cold PBS using a Potter homogenizer was applied obtaining a good number of cells. Moreover, we found that homogenization technique was much quicker and simpler than enzyme treatment under this condition. Comparable results have been reported by others (29, 37) using similar technique, which isolates nuclei to apply comet assay in liver, lung, spleen, kidney and bone marrow cells.

From our results, antioxidant defense and oxidative stress showed comparable degree of oxidative injury evaluated in plasma and in lung tissue. It was interesting to note that target tissue had a significant correlation with plasma relating to antioxidant performance and DNA damage, suggesting that oxidative damage analyzed in peripheral blood can be correlated with target tissue for DNA damage analyzed by comet assay and overall antioxidant defense using TAP assay. In agreement, Wiencke et al. (44) reported a positive correlation between DNA adduct levels in blood mononuclear cells and lung tissue using the ^{32}P -postlabeling assay, measuring aromatic hydrophobic DNA adducts in 143 patients with lung cancer.

A few studies have reported the effect of oxygen exposure on DNA damage evaluated by comet assay in lung cells. Barker et al. (5) using comet assay found that mice exposed to 95% oxygen more than 8 hours increased DNA base damage in the entire population of pulmonary cells compared to mice in room air (5). Similar results for DNA fragmentation in tissue sections *in situ* and type II cells were observed by others using TUNEL assay and comet assay (4, 35). In the current study, animals in the healthy group were not exposed to oxygen, whereas animals subjected to the

CMV or HFOV were exposed to 100% oxygen for a short period. Considering that TAP and DNA damage in animals assigned to the HFOV group were comparable to those in the healthy group, it is probable that the low tidal volume and mean airway pressure used in the HFOV method exert protective effect against oxidative stress.

Conclusions

In summary, this study demonstrates that DNA damage analysis by comet assay and overall antioxidant defense by TAP assay can identify the oxidative stress in this experimental model of ALI. The significant correlation between comet and TAP assay in target tissue and peripheral blood suggests that peripheral blood could be used for large epidemiologic studies conducted in the field, when target tissue is not possible to be accessed, although further studies warrant evaluating the correlation between target tissue and peripheral blood cells for DNA damage in humans. HFOV showed substantial benefits in this animal model of ALI compared with CMV.

Acknowledgements

We thank Experimental Laboratory of Pediatrics Department-UNESP and Carotenoids & Health Laboratory at Human Nutrition Research Center on Aging - Tufts University staff for their assistance. Any opinions, findings, conclusion, or recommendations expressed in this publication are those of the author(s) and do not necessarily reflect the view of the UNESP or U.S. Dept of Agriculture.

Grants

Supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, São Paulo, SP, process number: 2008/08199-2 and by a grant from the U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service under Cooperative Agreement, USDA:1950-51000-065-08S.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CFR, JRF, ALAF and KJY contributed to the study design, data processing, and drafting of the manuscript. CRC, CSK, CBBR, and CFR participate in data acquisition.

References:

1. **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* 279: L1137-1145, 2000.
2. **Aldini G, Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI.** A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med* 31: 1043-1050, 2001.
3. **Allardet-Servent J, Bregeon F, Delpierre S, Steinberg JG, Payan MJ, Ravailhe S, Papazian L.** High-frequency percussive ventilation attenuates lung injury in a rabbit model of gastric juice aspiration. *Intensive Care Med* 34: 91-100, 2008.
4. **Barazzone C, Horowitz S, Donati YR, Rodriguez I, Piguet PF.** Oxygen toxicity in mouse lung: pathways to cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 573-581, 1998.
5. **Barker GF, Manzo ND, Cotich KL, Shone RK, Waxman AB.** DNA damage induced by hyperoxia: quantitation and correlation with lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 277-288, 2006.
6. **Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russell RM, Krinsky NI, Yeum KJ.** Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem* 354: 290-298, 2006.
7. **Bhatia M, Moochhala S.** Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 202: 145-156, 2004.

8. **Braz MG, Favero Salvadori DM.** Influence of endogenous and synthetic female sex hormones on human blood cells in vitro studied with comet assay. *Toxicol In Vitro* 21: 972-976, 2007.
9. **Brendler-Schwaab SY, Schmezer P, Liegibel U, Weber S, Michalek K, Tompa A, Pool-Zobel BL.** Cells of different tissues for in vitro and in vivo studies in toxicology: Compilation of isolation methods. *Toxicol In Vitro* 8: 1285-1302, 1994.
10. **Collins AR.** The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26: 249-261, 2004.
11. **Collins AR.** The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol* 203: 163-177, 2002.
12. **Dahlem P, van Aalderen WM, Bos AP.** Pediatric acute lung injury. *Paediatr Respir Rev* 8: 348-362, 2007.
13. **Duthie SJ, Pirie L, Jenkinson AM, Narayanan S.** Cryopreserved versus freshly isolated lymphocytes in human biomonitoring: endogenous and induced DNA damage, antioxidant status and repair capability. *Mutagenesis* 17: 211-214, 2002.
14. **Ferreira AL, Yeum KJ, Matsubara LS, Matsubara BB, Correa CR, Pereira EJ, Russell RM, Krinsky NI, Tang G.** Doxorubicin as an antioxidant: maintenance of myocardial levels of lycopene under doxorubicin treatment. *Free Radic Biol Med* 43: 740-751, 2007.
15. **Fioretto JR, Campos FJ, Ronchi CF, Ferreira AL, Kurokawa CS, Carpi MF, Moraes MA, Bonatto RC, Defaveri J, Yeum KJ.** Effects of Inhaled Nitric Oxide on Oxidative Stress and Histopathological and Inflammatory Lung Injury in a Saline-Lavaged Rabbit Model of Acute Lung Injury. *Respir Care (In press)* 2011.
16. **Forchhammer L, Johansson C, Loft S, Moller L, Godschalk RW, Langie SA, Jones GD, Kwok RW, Collins AR, Azqueta A, Phillips DH, Sozeri O, Stepnik**

- M, Palus J, Vogel U, Wallin H, Routledge MN, Handforth C, Allione A, Matullo G, Teixeira JP, Costa S, Riso P, Porrini M, Moller P.** Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. *Mutagenesis* 25: 113-123, 2010.
17. **Girard TD, Bernard GR.** Mechanical ventilation in ARDS: a state-of-the-art review. *Chest* 131: 921-929, 2007.
 18. **Grotto D, Maria LS, Valentine J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Pomblum VJ, Rocha JB, Farina M.** Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova* 32: 169-174, 2009.
 19. **Grune T, Berger MM.** Markers of oxidative stress in ICU clinical settings: present and future. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 712-717, 2007.
 20. **Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR.** Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18: 45-51, 2003.
 21. **Imai Y, Nakagawa S, Ito Y, Kawano T, Slutsky AS, Miyasaka K.** Comparison of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation. *J Appl Physiol* 91: 1836-1844, 2001.
 22. **Johansson C, Moller P, Forchhammer L, Loft S, Godschalk RW, Langie SA, Lumeij S, Jones GD, Kwok RW, Azqueta A, Phillips DH, Sozeri O, Routledge MN, Charlton AJ, Riso P, Porrini M, Allione A, Matullo G, Palus J, Stepnik M, Collins AR, Moller L.** An ECVAG trial on assessment of oxidative damage to DNA measured by the comet assay. *Mutagenesis* 25: 125-132, 2010.

23. **Kietzmann D, Kahl R, Muller M, Burchardi H, Kettler D.** Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med* 19: 78-81, 1993.
24. **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* 298: 111-120, 2000.
25. **Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN.** Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* 25: 53-64, 2009.
26. **Ladeira MS, Bueno RC, Dos Santos BF, Pinto CL, Prado RP, Silveira MG, Rodrigues MA, Bartchewsky W, Jr., Pedrazzoli J, Jr., Ribeiro ML, Salvadori DM.** Relationship among oxidative DNA damage, gastric mucosal density and the relevance of cagA, vacA and iceA genotypes of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 53: 248-255, 2008.
27. **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* 27: 1738-1744, 1999.
28. **Mehta S, Granton J, MacDonald RJ, Bowman D, Matte-Martyn A, Bachman T, Smith T, Stewart TE.** High-frequency oscillatory ventilation in adults: the Toronto experience. *Chest* 126: 518-527, 2004.
29. **Miyamae Y, Yamamoto M, Sasaki YF, Kobayashi H, Igarashi-Soga M, Shimoi K, Hayashi M.** Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutat Res* 418: 131-140, 1998.

30. **Moller P, Moller L, Godschalk RW, Jones GD.** Assessment and reduction of comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group. *Mutagenesis* 25: 109-111, 2010.
31. **O'Reilly MA.** DNA damage and cell cycle checkpoints in hyperoxic lung injury: braking to facilitate repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L291-305, 2001.
32. **P. Møller SL.** Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. *Free Radic Biol Med* 41: 388-415., 2006.
33. **Quinlan GJ, Evans TW, Gutteridge JM.** Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res* 20: 289-298, 1994.
34. **Ronchi CF, Ferreira AL, Campos FJ, Kurokawa CS, Carpi MF, de Moraes MA, Bonatto RC, Defaveri J, Yeum KJ, Fioretto JR.** High-frequency oscillatory ventilation attenuates oxidative lung injury in a rabbit model of acute lung injury. *Exp Biol Med* 236: 1188–1196, 2011.
35. **Roper JM, Mazzatti DJ, Watkins RH, Maniscalco WM, Keng PC, O'Reilly MA.** In vivo exposure to hyperoxia induces DNA damage in a population of alveolar type II epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L1045-1054, 2004.
36. **Rotta AT, Gunnarsson B, Fuhrman BP, Hernan LJ, Steinhorn DM.** Comparison of lung protective ventilation strategies in a rabbit model of acute lung injury. *Crit Care Med* 29: 2176-2184, 2001.
37. **Sasaki YF, Tsuda S, Izumiyama F, Nishidate E.** Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat Res* 388: 33-44, 1997.

38. **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191, 1988.
39. **Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF.** Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221, 2000.
40. **Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP.** The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol* 283: 157-164, 1991.
41. **Turner DA, Arnold JH.** Insights in pediatric ventilation: timing of intubation, ventilatory strategies, and weaning. *Curr Opin Crit Care* 13: 57-63, 2007.
42. **Vahlquist A, Duvic M.** *Retinoids and carotenoids in dermatology*. New York: Informa Healthcare USA, 2007.
43. **Ware LB, Matthay MA.** The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334-1349, 2000.
44. **Wiencke JK, Thurston SW, Kelsey KT, Varkonyi A, Wain JC, Mark EJ, Christiani DC.** Early age at smoking initiation and tobacco carcinogen DNA damage in the lung. *J Natl Cancer Inst* 91: 614-619, 1999.
45. **Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA.** Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med* 28: 143-149, 2000.
46. **Winterbourn CC, Carr AC.** Myeloperoxidase-dependent loss of malondialdehyde: a limitation for detecting neutrophil-mediated lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 302: 461-467, 1993.

47. **Yeum KJ, Beretta G, Krinsky NI, Russell RM, Aldini G.** Synergistic interactions of antioxidant nutrients in a biological model system. *Nutrition* 25: 839-846, 2009.
48. **Zhao X, Aldini G, Johnson EJ, Rasmussen H, Kraemer K, Woolf H, Musaeus N, Krinsky NI, Russell RM, Yeum KJ.** Modification of lymphocyte DNA damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 83: 163-169, 2006.

2. Interactive effects of mechanical ventilation, inhaled nitric oxide and oxidative stress in acute lung injury

Este manuscrito está sendo elaborado a partir da idéia de que o óxido nítrico inalatório (NOi) tem papel importante sobre o metabolismo oxidativo pulmonar, uma vez que este gás é um potente vasodilatador local, que melhora a circulação pulmonar, com consequente aumento da oxigenação e também apresenta ação protetora contra a lesão pulmonar oxidativa, sem provocar vasodilatação sistêmica.

O NOi tem sido utilizado como tratamento adjuvante em pacientes com SDRA. Em nosso estudo o gás foi associado ou não a diferentes modos de ventilação mecânica com o objetivo de avaliar a interação entre o NOi e o tratamento com a ventilação mecânica pulmonar. Secundariamente, este estudo objetivou avaliar a presença de NO na circulação sistêmica dos animais por meio da medida da concentração dos produtos do NO plasmático (NOx).

De nosso conhecimento, não existem estudos que tenham avaliado a interação dos efeitos do NOi sobre o metabolismo oxidativo pulmonar na fisiopatologia da LPA/SDRA, associado ou não aos diferentes tratamentos com ventilação mecânica convencional protetora ou ventilação oscilatória de alta frequência.

A seguir apresentaremos o resumo do manuscrito que está em fase de elaboração.

ABSTRACT

Objective: To compare protective conventional mechanical ventilation (CMV) and high-frequency oscillatory ventilation (HFOV) associated with/without inhaled nitric oxide (iNO) for oxygenation, antioxidant/oxidative stress status, DNA damage, inflammatory and histopathological lung injury in a rabbit model of acute lung injury.

Design: Prospective, sham controlled, and *in vivo* animal study.

Setting: University animal research facility.

Subjects: Forty male 8 weeks old Norfolk white rabbits.

Interventions: Rabbits were instrumented with tracheotomy and vascular catheters. Lung injury was induced by tracheal infusion of warm saline. Animals were ventilated at FiO₂ 1.0 and assigned to one of five groups: a) Sham Control (CG): without ALI + CMV; b) ALI + CMV (MVG); c) ALI + CMV + iNO (MVGNO); d) ALI + HFOV (HFG), and e) ALI + HFOV + iNO (HFGNO). Overall antioxidant defense/oxidative stress was assessed in lung tissue and plasma by total antioxidant performance (TAP) assay and oxidative DNA damage by a single cell gel electrophoresis. Ventilatory and hemodynamic parameters were recorded every 30 minutes up to 4 hours.

Measurements and Main Results: ALI groups showed worse oxygenation as compared to those of CG after lung injury (CG: 438.4 ± 87.1 > MVG: 79.9 ± 12.7 = MVGNO: 80.7 ± 24 = HFG: 66.2 ± 34.2 = HFGNO: 56 ± 21 ; $p < 0.05$). After 4 hours of mechanical ventilation, HFOV groups presented significant improvement in oxygenation (PaO₂, CG: 465.9 ± 30.5 = HFG: 399.1 ± 98.2 = HFGNO: 326.9 ± 119 > MVG: 232.7 ± 104 = MVGNO: 218.3 ± 118 ; $p < 0.05$). HFOV and CMV associated with iNO showed significant reduction in lung oxidative stress (TAP, % protection: CG: 59.4 ± 4.52 = MVGNO: 56.3 ± 2.40 = HFG: 69.0 ± 4.99 = HFGNO: 68.9 ± 4.14 > MVG: 47.6 ± 2.58 ; $p < 0.05$) and DNA damage (CG: 10.6 ± 5.79 = MVGNO: 8.5 ± 3.06 = HFG:

$8.6 \pm 2.42 = \text{HFGNO}: 7.1 \pm 2.18 < \text{MVG}: 29.9 \pm 12.37; p < 0.001$) compared to CMV group without iNO. There was no significant difference in plasma NO concentration among groups.

Conclusions: High-frequency oscillatory ventilation and inhaled nitric oxide showed protective effect against oxidative lung injury in a rabbit model of acute lung injury. Also, protective conventional mechanical ventilation associated with iNO had reduced oxidative DNA damage compared to CMV without iNO.

IV – Comentários finais

A LPA e a SDRA são doenças respiratórias graves e que motivam a internação ou complicam a evolução de crianças e adultos gravemente enfermos. A evolução muitas vezes dramática destes pacientes exige busca incessante de novas formas de tratamento e melhor entendimento da fisiopatologia.

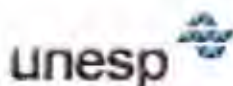
Sabidamente, a doença apresenta fisiopatologia complexa, com lesão pulmonar extensa e consequente diminuição da relação V/Q e da oxigenação. Desta forma, além da estabilização hemodinâmica e hidreletrolítica, a ventilação mecânica é parte fundamental do tratamento. Apesar da utilização da VM protetora, nem sempre os pacientes respondem satisfatoriamente, necessitando de outras modalidades ventilatórias e tratamentos adjuvantes.

O trabalho apresentado como tese comparou diferentes modos de ventilação mecânica na LPA induzida experimentalmente e concluiu que a VAF se associou a menor lesão pulmonar oxidativa, ou seja, maior proteção pulmonar quando o método de avaliação foi o TAP. A propósito, este é o primeiro estudo a utilizar tal metodologia de avaliação do estresse oxidativo em LPA.

O primeiro artigo citado como Desdobramento da tese, “Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury induced in rabbits submitted to different strategies of mechanical ventilation”, demonstrou que a análise da lesão de DNA verificada pelo teste do cometa e a capacidade antioxidante total, avaliada pelo TAP, identificaram o estresse oxidativo pulmonar no modelo empregado, de forma a se entender que ambos possam ser considerados biomarcadores do estresse oxidativo. O fato de ter havido correlação positiva significativa entre TAP no tecido pulmonar e no sangue periférico, da mesma forma que para o teste do cometa, sugere que tais

métodos possam ser aplicados em estudos clínicos nos quais a obtenção do tecido alvo não é viável.

O segundo artigo que está em fase de elaboração, “Interactive effects of mechanical ventilation, inhaled nitric oxide, and oxidative stress in acute lung injury”, abordará a utilização de diferentes modos ventilatórios, associados ou não ao NOi, sobre o estresse oxidativo pulmonar.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970

Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

May 5th 2009

TO WHOM IT MAY CONCERN

The aim of this letter is to state that the project entitled "*Effects of different mechanical ventilation techniques on the pulmonary oxidative stress induced by model of acute respiratory distress syndrome in rabbits.*" [document 600 *Efeito de diferentes técnicas de ventilação mecânica no estresse oxidativo pulmonar induzido por modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo em coelhos*] was approved by the Animal Research Ethics Committee of Faculdade de Medicina de Botucatu.UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

Sincerely yours,

Profª Drª. Regina Helena Garcia. Martins
Research Ethics Committee of Faculdade de Medicina de Botucatu.UNESP
Botucatu, SP, Brazil.