



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**Fábio Joly Campos**

**COMPARAÇÃO ENTRE VENTILAÇÃO MECÂNICA  
CONVENCIONAL PROTETORA E VENTILAÇÃO  
OSCILATÓRIA DE ALTA FREQUENCIA, ASSOCIADAS  
AO NOi, QUANTO AOS EFEITOS SOBRE  
OXIGENAÇÃO, LESÃO HISTOLÓGICA E DANO  
OXIDATIVO PULMONAR EM MODELO DE LESÃO  
PULMONAR AGUDA INDUZIDA EM COELHOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Titular José Roberto Fioretto

**Botucatu**  
**2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**Fábio Joly Campos**

**COMPARAÇÃO ENTRE VENTILAÇÃO MECÂNICA  
CONVENCIONAL PROTETORA E VENTILAÇÃO  
OSCILATÓRIA DE ALTA FREQUENCIA, ASSOCIADAS AO  
NOi, QUANTO AOS EFEITOS SOBRE OXIGENAÇÃO,  
LESÃO HISTOLÓGICA E DANO OXIDATIVO PULMONAR  
EM MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA  
EM COELHOS**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, para obtenção do  
título de Doutor em Fisiopatologia em  
Clínica Médica.

**Orientador: Prof. Titular José Roberto Fioretto**

**Botucatu**  
**2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Campos, Fabio Joly.

Comparação entre ventilação mecânica convencional protetora e ventilação oscilatória de alta frequência, associadas ao NOi, quanto aos efeitos sobre oxigenação, lesão histológica e dano oxidativo pulmonar em modelo de lesão pulmonar aguda induzida em coelhos / Fabio Joly Campos. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: José Roberto Fioretto  
Capes: 40101002

1. Análise de DNA. 2. Respiração artificial. 3. Ventilação de alta frequência. 4. Stress oxidativo. 5. Ensaio cometa.

Palavras-chave: Dano ao DNA; Estresse oxidativo pulmonar; NOi; Ventilação mecânica convencional; Ventilação oscilatória de alta frequência.

*Dedicatória*

*A **Claudia**, minha esposa, por estar sempre ao meu lado e por toda a sua compreensão , mesmo nos momentos difíceis que passamos sempre me apoiou e fez de tudo para me ajudar a realizar todos os meus sonhos, sem ela nada disso seria possível!*

*Aos meus pais **Gregório** e **Madalena** que foram os precursores de tudo, me ensinaram quais caminhos seguir e sempre estiveram a meu lado*

*Aos meus irmãos **Fernando** e **Beatriz** por todos os conselhos e ajuda*

*Ao meu orientador e amigo **José Roberto Fioretto**, por sua eterna disposição em ajudar. Pelos seus incentivos e por sua compreensão pelas dificuldades encontradas e apoio para enfrentá-las*

---



## *Agradecimientos*

*Um agradecimento especial ao Dr. **Fernando Ronchi** e a Dra **Cilmery** por ajudar em todas as etapas deste trabalho. Suas orientações e ajudas foram muito preciosas*

*À todos os amigos da UTI pediátrica de Botucatu, em especial **Mário, Rossano e Marcos** que ajudaram na realização deste trabalho e tanta diferença fizeram na minha formação profissional*

*Aos funcionários do laboratório da Pediatria que sempre me apoiaram, sem sua ajuda não teria conseguido*

*Ao professor **Carlos Alberto Padovani** pela orientação na análise estatística*

*As amigas **Fernanda, Lia, Atsuko e Rafaela**, médicas da UTI pediátrica da Faculdade de Medicina de Marília por entenderem minhas ausências nesse período e pelo seu apoio durante todos estes anos*

---



## *Índice*

---

<b>I- Fundamentação e Justificativa da Tese.....</b>	<b>11</b>
<b>1- Síndrome do desconforto respiratório agudo.....</b>	<b>13</b>
1.1 Fisiopatologia e Critérios Diagnósticos.....	14
1.2 Fases Evolutivas.....	15
1.3 Etiologia.....	17
1.4 Tratamento Ventilatório da LPA/SDRA.....	17
1.4.1 Ventilação Mecânica Protetora.....	17
1.4.2 Ventilação Oscilatória de Alta Frequência.....	19
1.5 Óxido Nítrico Inalatório (NOi).....	22
<b>2 – Referências Bibliográficas.....</b>	<b>27</b>
<b>II- Artigo Original .....</b>	<b>38</b>
<b>III- A Tese (artigo publicado).....</b>	<b>45</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>47</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>48</b>
<b>2. Métodos.....</b>	<b>49</b>
2.1 Desenho, animais e instrumentação.....	50
2.2 Indução da lesão pulmonar .....	51
2.3 Grupos experimentais.....	51
2.4 Administração de óxido nítrico inalatório .....	52
2.5 Coleta do tecidos .....	53
2.6 Lavado broncoalveolar .....	53
2.7 Análise antioxidante total .....	53
2.8 Análise do dano ao DNA no tecido pulmonar .....	54
2.9 Determinação dos produtos do óxido nítrico no plasma .....	54
2.10 Análise estatística.....	54
<b>3. Resultados.....</b>	<b>56</b>
3.1 Hemodinâmica, mecânica pulmonar e troca gasosa.....	56
3.2 Lesão oxidativa.....	59

---

3.2 Lesão oxidativa .....	49
3.2.1 Capacidade antioxidante e total .....	59
3.2.2 Análise do dano ao DNA em tecido pulmonar .....	59
3.3 Contagem de células polimorfonucleares.....	59
3.4 Quantificação dos produtos do óxido nítrico no plasma .....	59
<b>4. Discussão.....</b>	<b>61</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>65</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>67</b>
<b>IV- Desdobramentos da tese.....</b>	<b>79</b>
<b>V- Considerações Finais.....</b>	<b>74</b>

---

*I — Fundamentação e Justificativa  
da Tese*

Este estudo teve como foco de análise a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), sua fisiopatologia e principais terapêuticas ventilatórias e adjuvantes não ventilatórias.

Apesar do progresso no entendimento da fisiopatologia da SDRA e o avanço em estratégias terapêuticas de pacientes com a síndrome, a mortalidade permanece elevada, variando de 40% a 60%<sup>1-5</sup>.

Embora os mecanismos da SDRA não sejam completamente elucidados<sup>6</sup>, várias evidências sugerem que pacientes portadores da síndrome estão expostos a elevado grau de estresse oxidativo (EO) induzido por uma variedade de eventos<sup>7-10</sup>. 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) com acúmulo de lesão oxidativa em biomoléculas<sup>11</sup>.

Alguns estudos demonstraram que existe redução de antioxidantes em pacientes com SDRA<sup>12, 13</sup>, entretanto, não há evidência clínica para a suplementação destes agentes para reduzir mortalidade ou morbidade. Por outro lado, a ventilação pulmonar mecânica (VM) constitui um dos principais pilares do tratamento da SDRA<sup>4</sup>, sendo capaz de modificar a evolução da doença e reduzir a mortalidade<sup>14</sup>. Existem dois métodos ventilatórios de proteção pulmonar utilizados na SDRA. Um é baseado na VM convencional (VMC)<sup>15</sup> e outro na ventilação oscilatória de alta frequência<sup>16-18</sup>.

A complexidade fisiopatológica e a gravidade de alguns casos de SDRA exigem a utilização de outras estratégias de tratamento além da VM. Assim é que o tratamento clínico da síndrome inclui controle da infecção subjacente, controle hidroeletrólítico e do estado hemodinâmico, suporte nutricional e otimização da VM protetora. Quando a hipoxemia persiste ou se agrava, terapias adjuvantes, como o óxido nítrico inalatório (NOi) podem ser utilizadas<sup>19</sup>.

Em trabalho anterior, nosso grupo estudou coelhos submetidos a lesão pulmonar aguda por meio de lavagem traqueal com salina aquecida e submetidos

---

a VMC protetora com o objetivo de avaliar os efeitos de baixas doses de NOi sobre o estresse oxidativo e lesão histopatológica e inflamatória dos pulmões. Concluímos que a utilização precoce de baixas doses do gás atenuou o estresse oxidativo e a lesão pulmonar histopatológica e inflamatória<sup>20</sup>.

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 de trabalho.

### 1. Síndrome do desconforto respiratório agudo

Ashbaugh et al.<sup>1</sup>, 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 infiltrados alveolares bilaterais ao exame radiológico do tórax e diminuição da complacência pulmonar. Posteriormente, com a Conferência de Consenso Americana-Europeia de 1994, 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 (LPA)<sup>21</sup>.

---

### *1.1 Fisiopatologia e Critérios Diagnósticos*

A SDRA 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 oxigênio<sup>22</sup>. A lesão de pneumócitos do tipo II, produtores de surfactante, e a inativação do surfactante pelo processo inflamatório também contribuem para o colapamento expiratório de unidades alveolares, com conseqüente redução da capacidade residual funcional. Além disso, existe aumento da resistência vascular pulmonar produzido por combinação complexa de lesão pulmonar primária, em conseqüência de 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 cardíaco<sup>23</sup>.

Os critérios diagnósticos da síndrome foram estabelecidos pela Conferência de Consenso Americana-Européia<sup>21</sup>, realizada em 1994, 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  $\leq 300$  para LPA, a despeito da pressão expiratória positiva utilizada; 3) presença de infiltrado bilateral na radiografia de tórax em posição frontal e 4) pressão capilar pulmonar  $\leq 18$  mmHg, quando medida, ou ausência de evidência clínica de hipertensão atrial esquerda.

Mais recentemente, a definição e os critérios diagnósticos da síndrome passaram por nova revisão, no que se denominou de Definição de Berlim<sup>24</sup>. Nos novos critérios diagnósticos foi especificado o tempo de uma semana de um evento clínico para caracterizar o quadro agudo, foram criados exemplos de radiografias de tórax e os critérios radiológicos aclarados, para determinação da origem do edema pulmonar foi introduzida a avaliação ecocardiográfica para excluir edema hidrostático, fatores de risco foram incluídos e quanto a

---

oxigenação a síndrome foi classificada, de acordo com a relação  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  e com a pressão final expiratória final positiva (PEEP) utilizada em: a) Leve:  $200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$  com  $\text{PEEP}$  ou  $\text{CPAP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$ ; b) Moderada:  $100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$  com  $\text{PEEP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$ ; Grave:  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$  com  $\text{PEEP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$ . Deixa de ser utilizado o termo LPA.

Apesar da Definição de Berlim representar avanço no estudo da SDRA, ainda apresentava algumas limitações, como o fato de não terem sido incluídas crianças nos estudos. Assim, após nova revisão, foi publicada em junho de 2015 por Khemani et al. Novos critérios para diagnóstico da SDRA em crianças. A principal mudança foi a adoção do índice de oxigenação (IO) e o índice de saturação de oxigênio e não apenas a relação  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  para estratificação da SDRA em leve, moderada e grave<sup>25</sup>.

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 SDRA permanece elevada, variando de 31% a 60% em adultos<sup>15</sup> e de 43% a 62% em crianças<sup>21,26</sup>.

## *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 terminal<sup>27</sup>.

A fase exsudativa corresponde à 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 interalveolar. Nesta fase, é característica a 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 adjacentes<sup>27</sup>. Há evidências de alterações ultraestruturais 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 alvéolo-capilar permite extravasamento do líquido intersticial para o espaço alveolar.

A fase proliferativa, entre a primeira e a terceira semanas de evolução da doença, 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 transformam 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. Depois de 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 serpentinadas 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<sup>27,28</sup>.

### *1.3 Etiologia*

A SDRA pode ser causada por agressão pulmonar direta (primária), como ocorre na aspiração, infecção pulmonar, afogamento e contusão pulmonar, ou pode ser provocada por agressão indireta (secundária), como na sepse, politraumatismo, em transfusões maciças de hemoderivados, entre outras<sup>29</sup>.

### *1.4 Tratamento Ventilatório da 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/Q<sup>30</sup>. 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 inspiratória de pico e de platô).

Em três trabalhos do grupo de Gattinoni<sup>31-33</sup> 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 mediamente lesadas. Paralelamente, diversas publicações<sup>34-37</sup> alertaram para a ocorrência de lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (LPIVM) ao se utilizar elevados

---

valores de volume corrente (10-15 mL/Kg) e de pico de pressão inspiratória (> 40 cmH<sub>2</sub>O), até então empregados rotineiramente.

A ideia que predomina atualmente é a de que o emprego de altos volumes correntes, que geram altas pressões inspiratórias na VM de pacientes com 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 pacientes<sup>38</sup>. Também, 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, em decorrência do volutrauma e do atelectrauma, 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)<sup>39</sup>.

Estes conhecimentos determinaram modificação substancial na maneira de utilizar a VM nestes pacientes, sendo introduzido o conceito de VM protetora. Assim, a recomendação atual para VM protetora em SDRA é a de que se utilize volume corrente de 5 a 7 mL/Kg, limitando a pressão de platô em 30 cmH<sub>2</sub>O, permitindo que a saturação arterial de oxigênio (SaO<sub>2</sub>) fique entre 88%-90% (hipoxemia permissiva) e que a PaCO<sub>2</sub> atinja valores de até 100 mmHg (hipercapnia permissiva)<sup>15</sup>. Além disso, a PEEP deve ser ajustada para manter aberta a maioria das unidades alveolares e prevenir seu colapso no final da expiração<sup>40</sup> e, com isso, reduzir o *shunt* intrapulmonar e melhorar a hipoxemia. A otimização da PEEP, na medida em 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 um 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<sub>2</sub>O, gradualmente, e

---

acompanhando seu efeito sobre a SaO<sub>2</sub>. Na UTIP da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, temos utilizado PEEP mínima de 10 cmH<sub>2</sub>O, na fase inicial do tratamento de lactentes e crianças com SDRA, aumentando gradualmente seu nível de 2 a 3 cmH<sub>2</sub>O de acordo com a resposta da SaO<sub>2</sub>, fixando o valor que se correlaciona com a melhor SaO<sub>2</sub>, e que permita reduzir a FiO<sub>2</sub> para menos de 60% sem causar sinais de hiperinsuflação pulmonar no exame radiológico de tórax<sup>41</sup>.

Recentemente, Amato et al., publicaram artigo no qual foram avaliados dados de ensaios clínicos realizados entre 1998 e 2008. Os autores observaram que o único parâmetro ventilatório que tem valor preditivo na evolução de paciente com SDRA é a chamada pressão de distensão (PD), calculada pela diferença entre a pressão de platô e a PEEP. Foi observado que o grupo com PD entre 8 e 15 cmH<sub>2</sub>O apresentou menor mortalidade. Apesar da importância deste trabalho, é necessário destacar que nos estudos avaliados os pacientes recebiam bloqueio neuromuscular, portanto, mais estudos deverão ser realizados para definir o real papel da PD no tratamento da SDRA<sup>42</sup>.

#### *1.4.2 Ventilação Oscilatória de Alta Frequência (VAF)*

Embora a VMC seja efetiva para a maioria das crianças, há um número significativo de pacientes com insuficiência respiratória grave nos quais a VMC pode não garantir a oxigenação e a ventilação. Nestes casos, a VAF passa ser uma alternativa atraente por suas características únicas<sup>43</sup>.

A VAF é um modo ventilatório que utiliza volume corrente menor do que o volume do espaço morto anômico (1–3 mL/Kg) com frequência bem acima da fisiológica (3–15 Hertz, ou seja, 180–900 ciclos/minuto). Esta forma de ventilação vem sendo utilizada com sucesso para o 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 SDRA<sup>44</sup>.

Trata-se de um aparelho de ventilação pulmonar mecânica com fluxo contínuo de gás que é capaz de eliminar o CO<sub>2</sub> 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 traqueia, diminuindo progressivamente ao longo da via aérea, resultando em baixa pressão de amplitude nos alvéolos<sup>45</sup>.

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 SDRA. Além disso, a manutenção do volume pulmonar, que evita superdistensão pulmonar e o aparecimento de atelectasia em pacientes com SDRA, e seu padrão de fluxo, podem melhorar a relação V/Q<sup>45</sup>.

Foi demonstrado em crianças com SDRA melhora significativa na oxigenação, redução na frequência de barotrauma e melhora dos resultados clínicos com o uso da VAF<sup>45</sup>. Em adultos com SDRA foi descrita melhora imediata e sustentada da relação PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> quando os pacientes foram submetidos à VAF combinada com manobras de recrutamento alveolar<sup>46</sup>. 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 VMC<sup>47</sup>.

Atualmente, muita atenção tem sido dada a utilização precoce da VAF<sup>48</sup>. Assim é que quando a SaO<sub>2</sub> for menor do que 90%, em FiO<sub>2</sub> ≥ 0,6 com pressão inspiratória (Pip) de 30-32 cmH<sub>2</sub>O e PEEP ≥ 10 cmH<sub>2</sub>O recomenda-se a transferência da criança da ventilação convencional para a VAF<sup>49</sup>.

---

Em 2010, foi publicada revisão sistemática seguida de metanálise a respeito da utilização da VAF em SDRA<sup>50</sup>. Os autores concluíram que a análise dos estudos favoreceu a utilização da VAF quanto a mortalidade em 30 dias. Da mesma forma, estudo realizado em recém-nascidos de muito baixo peso concluiu que a VAF, comparada com a ventilação mandatória intermitente sincronizada, permitiu extubação mais precoce e reduziu a incidência de displasia bronco pulmonar<sup>51</sup>.

Apesar das características atraentes da VAF para ser utilizada na SDRA, dois estudos randomizados recentes, realizados em pacientes adultos, não demonstraram efeitos benéficos dessa estratégia ventilatória quanto a mortalidade. O chamado *OSCAR Trial*<sup>52</sup> avaliou 785 pacientes de 29 hospitais do Reino Unido e comparou VAF com um grupo de pacientes submetidos a ventilação convencional e não observou diferença de mortalidade. Ocorre que os pacientes que foram submetidos a VAF utilizaram um ventilador nunca utilizado em outros estudos e diferente daquele da prática clínica. Além disso, muitos centros relataram que não tinham experiência com a VAF. Paralelamente, foi publicado o *OSCILLATE Trial*<sup>53</sup>. Também um estudo multicêntrico randomizado que foi interrompido depois da inclusão de 548 pacientes por aumento de mortalidade no grupo submetido a VAF. Novamente, o estudo mostrou problemas metodológicos, pois o grupo VAF incluiu pacientes mais graves, com maior instabilidade hemodinâmica e que fizeram uso de vasopressores e bloqueadores neuromusculares em frequência significativamente maior.

Para completar a análise de estudos clínicos, a última metanálise sobre o tema concluiu que a VAF não reduz a mortalidade em adultos com SDRA, mas não aumenta o risco de barotrauma ou determina maior chance de hipotensão e, de fato, reduz o risco de falência de oxigenação<sup>54</sup>.

Em 2011, nosso grupo publicou estudo experimental em coelhos submetidos à lesão pulmonar aguda por meio de lavagem traqueal com salina aquecida com o objetivo de comparar VAF com VMC protetora quanto a

---

performance antioxidante, oxigenação e lesão histopatológica e inflamatória dos pulmões<sup>55</sup>. Nesse trabalho, de forma inédita, foi empregado o método da capacidade antioxidante total (TAP). A TAP 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 oxidativo<sup>56</sup>. Este método foi validado para utilização no plasma por Beretta et al.<sup>57</sup> e posteriormente aplicado em tecidos biológicos por Ferreira et al.<sup>58</sup>. 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-ndecanóico] por meio de um gerador de radical lipoperoxil (LOO•) do compartimento lipofílico denominado MeO-AMVN [2,2 $\phi$ -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 fluorescente<sup>57</sup>. Concluimos que a VAF 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 VMC protetora.

### *1.5 Óxido Nítrico Inalatório (NOi)*

A complexidade fisiopatológica e a elevada taxa de mortalidade observada na SDRA exigem a implementação de outras estratégias de tratamento diferentes da ventilação pulmonar mecânica.

Levando-se em conta a fisiopatologia da doença, entende-se que a administração de medicações vasodilatadoras seria útil na terapêutica da síndrome por possibilitar reequilíbrio da relação V/Q. No entanto, os vasodilatadores intravenosos disponíveis no mercado não apresentam especificidade para o leito vascular pulmonar e podem reduzir a pressão arterial

---

sistêmica, agravando ainda mais o *shunt* intrapulmonar por vasodilatação não seletiva de artérias que perfundem áreas pulmonares mal ventiladas, com piora da relação V/Q nestas áreas e diminuição da PaO<sub>2</sub><sup>59</sup>.

O NOi é um vasodilatador pulmonar seletivo que exerce seus efeitos somente em áreas pulmonares ventiladas. Atua no controle do tônus vascular por meio da ativação da guanil-ciclase e aumento da produção do GMP-cíclico, levando a relaxamento da musculatura lisa vascular. Desta forma, há aumento do fluxo sanguíneo para essas áreas e desvio do sangue de regiões mal ventiladas, com otimização da relação V/Q<sup>60</sup>. Esta ação determina melhora da oxigenação, redução da resistência vascular pulmonar e, portanto, diminuição da pós-carga ventricular direita, com aumento do débito cardíaco<sup>61</sup>.

Os efeitos descritos poderiam ser úteis na SDRA, pois permitiriam a redução de parâmetros ventilatórios, com diminuição do risco de aparecimento de LPIVM e redução da morbidade e da mortalidade<sup>62</sup>. Destaca-se que, devido à alta afinidade pela hemoglobina, o NO, quando administrado por via inalatória, é inativado rápida e especificamente no sangue, não promovendo vasodilatação da circulação sistêmica<sup>63</sup>.

O primeiro trabalho que avaliou os efeitos biológicos do NOi foi publicado em 1993 por Rossaint et al<sup>64</sup>. Os autores estudaram 10 pacientes adultos com SDRA e observaram diminuição do *shunt* intrapulmonar e melhora da oxigenação arterial. Posteriormente, em 1994, Abman et al.<sup>65</sup> descreveram efeitos benéficos do NOi sobre a oxigenação, hipertensão pulmonar e índice cardíaco em crianças com SDRA, sem influência na mortalidade.

Procurando demonstrar se a administração de NOi melhora a oxigenação por tempo prolongado, vários estudos realizados em adultos<sup>66-68</sup> e em crianças<sup>69,70</sup> evidenciaram apenas resposta imediata ao gás. Em pediatria, Dobyns et al.<sup>71</sup>, estudando 108 pacientes com insuficiência respiratória aguda (índice de oxigenação: IO > 15 cmH<sub>2</sub>O/mmHg), observaram resposta prolongada ao NOi quando comparado com placebo, ao longo de 72 horas, em dois subgrupos de

---

pacientes, aqueles com  $IO \geq 25$  cmH<sub>2</sub>O/mmHg no início do estudo e nos pacientes imunodeprimidos. Os autores consideraram que a terapia com NOi não sustentou a melhora na oxigenação em todos os pacientes porque os mesmos foram incluídos no estudo em estágios tardios da doença (três a cinco dias depois do diagnóstico).

Seguindo a ideia dos efeitos benéficos da administração precoce, publicamos, em 2001, protocolo de administração precoce de NOi em crianças com SDRA. Demonstramos melhora imediata e sustentada da oxigenação utilizando o gás tão precocemente quanto 12 horas depois do diagnóstico da doença, suportando a hipótese de que o tratamento iniciado logo depois do diagnóstico pode ser mais efetivo<sup>72</sup>.

Em 2003, *The Cochrane Library* publicou revisão sistemática sobre os efeitos do NOi em insuficiência respiratória hipoxêmica aguda de adultos e crianças, com atualização em 2006<sup>73</sup>. Cinco estudos randomizados e controlados foram analisados, avaliando 535 pacientes. A revisão concluiu que o NOi é útil apenas como terapia de salvamento, nas primeiras 24 horas de doença. Vale ressaltar que dos cinco estudos analisados, apenas o de Dobyns et al.<sup>71</sup> foi realizado em crianças e que a conclusão final indicou que o potencial efeito da terapia com NOi em pacientes com SDRA está para ser definido, principalmente em crianças.

Em 2004, analisamos os efeitos da administração precoce de NOi na SDRA comparando um grupo composto de crianças seguidas prospectivamente e que recebeu NOi associado à terapia convencional (GNOi) com um grupo histórico de pacientes que utilizou apenas terapia convencional (GTC). Nosso objetivo central foi determinar o efeito imediato e sustentado do NOi sobre alguns índices de oxigenação e parâmetros ventilatórios. A terapia com NOi foi introduzida tão cedo quanto 1,5 hora depois do diagnóstico de SDRA, em pacientes otimamente ventilados com níveis apropriados de Peep ( $\geq 10$ cmH<sub>2</sub>O). Demonstramos melhora imediata da relação  $PaO_2/FiO_2$  e do índice de

---

oxigenação. Da mesma forma, o tratamento prolongado associou-se com melhora da oxigenação, tanto que a  $FiO_2$  e a  $Pip$  puderam ser rápida e significativamente reduzidas. A taxa de mortalidade para o GNOi foi significativamente mais baixa (GTC: 10/21- 47,6%; GNOi: 3/18 – 16,6%,  $p<0,001$ ). A mediana do tempo de tratamento com o gás foi de 2 dias (1 – 6) e a dose média utilizada de  $4,03\pm 1,59$ ppm. Concluímos que o tratamento precoce com NOi causa melhora imediata e sustentada da oxigenação, com redução mais precoce de parâmetros ventilatórios associados com alto risco de lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica e toxicidade pelo oxigênio, o que pode contribuir para redução da taxa de mortalidade. Especulamos que o emprego do NOi tenha permitido redução da agressividade da VM, com diminuição da mortalidade<sup>74</sup>.

Estes resultados podem ser explicados, em parte, pois o NOi e os produtos de sua oxidação apresentam efeitos antiinflamatórios (diminuição da ativação de linfócitos e da adesão leucocitária) e interferem com o metabolismo oxidativo<sup>75</sup>. Sustentando a hipótese de que a administração precoce de NOi pode ser benéfica na SDRA, Razavi et al.<sup>76</sup> publicaram estudo sobre os efeitos do NOi em lesão pulmonar induzida por sepse, em modelo experimental de ratos. Os autores concluíram que a exposição precoce ao NOi no curso da lesão pulmonar aguda induzida por sepse associa-se à redução da infiltração leucocitária e menor lesão oxidativa, sendo que o NO pode ser de grande benefício se administrado mais precocemente na história natural da lesão pulmonar aguda.

Atestando a atualidade e a importância do assunto, em maio de 2007 foi publicada nova revisão sistemática seguida de metanálise a respeito dos efeitos do NOi sobre a oxigenação e mortalidade na lesão pulmonar aguda em adultos e crianças<sup>77</sup>. Foram computados 12 estudos envolvendo 1.237 pacientes. Os autores concluíram que o NO se associa à limitada melhora da oxigenação em pacientes com SDRA e não confere benefício quanto à mortalidade. Ocorre que dos 12 estudos avaliados apenas dois foram conduzidos em crianças, sendo um

---

deles o de Dobyns et al.<sup>71</sup>, comentando anteriormente, e o outro de Day et al.<sup>69</sup>. Assim como no trabalho de Dobyns et al.<sup>71</sup>, Day et al.<sup>69</sup> administraram NO tardiamente, depois de  $3,8 \pm 1,8$  dias de ventilação mecânica. Outro fator que interfere com a resposta ao NOi, além do tempo de introdução do gás, é o grau de abertura dos alvéolos, sendo sua ação clínica tanto maior quanto maior for o grau de recrutamento de unidades alveolares<sup>78</sup>, principalmente aquele induzido pela VAF<sup>79</sup>. Esse fator não foi considerado nos estudos citados.

Considerando que a manutenção da abertura dos alvéolos é mais facilmente obtida com a utilização da VAF e que o gás necessita de alvéolo aberto para atravessá-lo e determinar vasodilatação, ganha interesse o estudo da associação de VAF e NOi. Assim, em 2011, nosso grupo testou a hipótese de que a associação de NOi (introduzido precocemente) com VAF melhora a oxigenação de forma mais consistente e duradoura que a associação óxido nítrico e VMC<sup>80</sup>. Foi realizado estudo prospectivo, randomizado e cruzado em crianças insuficiência respiratória hipoxêmica que concluiu que tanto a VAF como VMC, associadas com administração precoce de NOi, melhoram a oxigenação. A VAF possibilita redução da  $FiO_2$  e aumento da relação  $PaO_2/FiO_2$  mais precoces quando comparado com VMC em 8h.

Foi assim que nasceu a ideia da tese ora apresentada, ou seja, aprofundar os conhecimentos das interações entre duas diferentes estratégias ventilatórias associadas ao NOi do ponto de vista experimental para avaliar os efeitos sobre oxigenação, lesão oxidativa, histopatológica e inflamatória dos pulmões.

---

## 2 – Referências Bibliográficas

1. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 2:319-23
  2. Dernaika TA, Keddissi JI, Kinasewitz GT. Update on ARDS: beyond the low tidal volume. *Am J Med Sci* 2009; 337:360-7
  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. Ciencewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:456-68; quiz 69-70
  7. 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
  8. 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
-

9. 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
  10. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; 202:145-56
  11. 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
  12. Quinlan GJ, Evans TW, Gutteridge JM. Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res* 1994; 20:289-98
  13. Ware LB. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 2006; 27:337-49
  14. 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
  15. 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
-

16. 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
  17. Turner DA, Arnold JH. Insights in pediatric ventilation: timing of intubation, ventilatory strategies, and weaning. *Curr Opin Crit Care* 2007; 13:57-63
  18. Girard TD, Bernard GR. Mechanical ventilation in ARDS: a state-of-the-art review. *Chest* 2007; 131:921-9.
  19. Bream-Rouwenhorst HR, Beltz EA, Ross MB et al. Recent developments in the management of acute respiratory distress syndrome in adults. *Am J Health-Syst Pharm* 2008; 65:29-36.
  20. Fioretto JR, Campos FJ, Ronchi CF et al. 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* 2012;57:273-81.
  21. 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.
  22. Sessler CN. Mechanical ventilation of patients with acute lung injury. *Crit Care Clin* 1998; 14:707-29, vii
  23. Sibbald WJ, Driedger AA, Myers ML, Short AI, Wells GA. Biventricular function in the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1983; 84:126-34.
-

24. Authors/Writing Committee and the Members of the ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome. The Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307:2526-33
  25. Khemani RG, Smith LS, Zimmerman, Erickson. Pediatric acute respiratory distress syndrome: Definition, incidence, and epidemiology: Proceedings from the acute lung injury consensus conference. *Pediatr Crit Care Med* 2015;16:S23-S40
  26. Okamoto K, Hamaguchi M, Kukita I, Kikuta K, Sato T. Efficacy of inhaled nitric oxide in children with ARDS. *Chest* 1998; 114:827-33
  27. Tomaszewski JF, Jr.: Patologia pulmonar na síndrome do desconforto respiratório do adulto, vol. 4: Interlivros; 1990.
  28. 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.
  29. 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
  30. 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
-

- 
31. 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
  32. Gattinoni L, Presenti A. ARDS: The non-homogeneous lung: facts and hypothesis. *Crit Care Diagnosis* 1987; 6:1-4
  33. 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
  34. 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.
  35. Hickling KG. Low volume ventilation with permissive hypercapnia in the Adult Respiratory Distress Syndrome. *Clin Intensive Care* 1992; 3:67-78
  36. Parker JC, Hernandez LA, Peevy KJ. Mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 1993; 21:131-43
  37. Slutsky AS. Mechanical ventilation. American College of Chest Physicians' Consensus Conference. *Chest* 1993; 104:1833-59
  38. Slutsky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest* 1999; 116:9S-15S
  39. 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
-

40. John J, Idell S. Strategies for Optimizing Oxygenation in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Clinical Pulmonary Medicine* 2004; 11:318-27
  41. Carpi MF e Fioretto JR. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. In: *Atualizações em Terapia Intensiva Pediátrica*. Jyh JH, Nóbrega RF e de Souza RL eds. Atheneu. São Paulo, 2007, p.141-156. ISBN: 978-85-7379-897-5
  42. Amato MBP, Meade MO, Slutsky AS, Brochard L, Costa ELV, Schoenfeld DA, Stewart TE, Briel M, Tamor D, Mercat A, Richard JCM, Carvalho CRR. Driving pressure and survival in the acute respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2015;372:747-755
  43. 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
  44. 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
  45. Lia Graciano A, Freid EB. High-frequency oscillatory ventilation in infants and children. *Curr Opin Anaesthesiol* 2002; 15:161-6
  46. 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
-

- 
47. Arnold JH. High-frequency ventilation in the pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med* 2000; 1:93-9
  48. Hemmila MR, Napolitano LM. Severe respiratory failure: advanced treatment options. *Crit Care Med* 2006; 34:S278-90
  49. Fioretto JR, Rebello CM. High-frequency oscillatory ventilation in pediatrics and neonatology. *Rev Bras Ter Intensiva* 2009; 21:96-103.
  50. Sud S, Freidrich JO, Meade MO et al. High frequency oscillation in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome (ARDS): systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2010; 340c:2327.
  51. Courtney SE, Durand DJ, Asselin JM et al. High-frequency oscillatory ventilation versus conventional mechanical ventilation for very-low-birth-weight infants. *N Eng J Med* 2002; 9:643-652.
  52. Young D, Lamb SE, Shah S et al. High-frequency oscillation for acute Respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2013; 368:806-813.
  53. Ferguson ND, Cook DJ, Guyatt GH et al. High-frequency oscillation in early acute Respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2013; 368:795-805.
  54. Gu XL, Wu GN, Yao YW et al. Is high-frequency oscillatory ventilation more effective and safer than conventional protective ventilation in adult acute respiratory distress syndrome patients? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care*. 2014 May 30;18(3):R111.
  55. Ronchi CF, Ferreira ALA, Campos FJ, et al. High-frequency oscillatory ventilation attenuates oxidative lung injury in a rabbit model of acute lung injury. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011; 236:1188–1196.
-

56. 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.
  57. Beretta G, Aldini G, Facino RM, et al. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem* 2006; 354:290-8.
  58. Ferreira AL, Yeum KJ, Matsubara LS, et al. Doxorubicin as an antioxidant: maintenance of myocardial levels of lycopene under doxorubicin treatment. *Free Radic Biol Med* 2007; 43:740-51.
  59. Radermacher P, Santak P, Becker H, et al. Prostaglandin E1 and nitroglycerin reduce pulmonary capillary pressure but worsen V/Q distribution in patients with adult respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1989; 70:601-609.
  60. Steggall MA and Playfor SD. High frequency oscillatory ventilation in pediatric intensive care: Clinical and therapeutics implications. In: Esquinas A and Volsko TA editors. *Yearbook of Respiratory care clinics and applied technologies*. Murcia, Tipografia San Francisco S.A.; 2008. p 753-758.
  61. Greene JH & Klinger JR. The efficacy of inhaled nitric oxide in the treatment of acute respiratory distress syndrome. In: Cook DJ and Levy MM eds. *Critical Care Clinics. Evidence-based critical care medicine*. Philadelphia: WB Saunders & Co., 14, 1998;387-410.
  62. Germain JF, Mercier JC, Casadevall I, Desplangues L, Hartmann JF and Beaufils F. Is there a role for inhaled nitric oxide in pediatric ARDS ? *Pediatr Pulmonol Suppl* 1995;11:110-12.
-

63. Moncada S & Higgs EA. The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
  64. Rossaint R; Falke KJ; Lopez FA; Slama K; Pison U and Zapol WM. Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993;328:399-4.
  65. Abman SH, Griebel JL, Parker DK, Schmidt JM, Swanton D, and Kinsella JP. Acute effects of inhaled nitric oxide in children with severe hypoxemic respiratory failure. *J Pediatr* 1994;124:881-8.
  66. Dellinger RP, Zimmerman JL, Taylor RW et al. Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome: results fo a randomized phase II trial. *Crit Care Med* 1998;26:15-23.
  67. Manktelow C, Bigatello LM, Hess D and Hurford WE. Physiologic determinants of the response to inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1997;82:297-307.
  68. Michael JR, Barton RG, Saffle JR, Mone M, Markewitz BA, Hillier K, et al. Inhaled nitric oxide versus conventional therapy. Effects on oxygenation in ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1372-80.
  69. Day RW, Allen EM and Witte MK. A randomized, controlled study of the 1-hour and 24-hour effects of inhaled nitric oxide therapy in children with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 1997;112:1324-31.
  70. Ream RS, Hauver JF, Lynch RE, Kountzman B, Gale GB, Mink RB. Low-dose inhaled nitric oxide improves the oxygenation and ventilation of infants and children with acute hypoxemic respiratory failure. *Crit Care Med* 1999; 27: 989-96.
-

71. Dobyns EL, Cornfield DN, Anas NG, Fortenberry JD, Tasker RC, Lynch A. Multicenter randomized controlled trial of the effects of inhaled nitric oxide therapy on gas exchange in children with acute hypoxemic respiratory failure. *J Pediatr* 1999;134:406-12.
  72. Fioretto JR, Bonatto RC, Ricchetti SMQ, et al. Early administration of inhaled nitric oxide to children with acute respiratory distress syndrome and its effects on oxygenation and ventilator settings: prospective preliminary report of ten patients. *Croat Med J* 2001;42:527-534.
  73. Sokol J, Jacobs SE, Bohn D. Inhaled nitric oxide for acute hypoxemic respiratory failure in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(3):CD002787.
  74. Fioretto JR, Moraes MA, Bonatto RC, et al. Acute and sustained effects of early administration of inhaled nitric oxide to children with acute respiratory distress syndrome. *Pediatr Crit Care Med* 2004; 5:469-474.
  75. Bevilacqua JG and De Caterina R. Inhaled nitric oxide: more than a selective pulmonary vasodilator. *Eur J Clin Invest* 2002; 32:628-635.
  76. Razavi HM, Werhun R, Scott JA, et al. Effects of inhaled nitric oxide in a mouse model of sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 2002; 30:868-873.
  77. Adhikary NKJ, Burns KEA, Friedrich JO, et al. Effect of nitric oxide on oxygenation and mortality in acute lung injury: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2007; 334:779-786. doi: 10.1136/bmj.39139.716794.55.
  78. Fioretto PCCM; Fioretto JR. Uso do óxido nítrico em pediatria. *J Pediatr (Rio J)* 2003;79(Supl.2):S177-S186.
-

79. Metha S, MacDonald R, Hallett DC, et al. Acute oxygenation response to inhaled nitric oxide when combined with high-frequency oscillatory ventilation in adults with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2003; 31:383-389.
80. Fioretto JR, Batista KA, Carpi MF, et al. High-Frequency Oscillatory Ventilation Associated With Inhaled Nitric Oxide Compared to Pressure-Controlled Assist/Control Ventilation and Inhaled Nitric Oxide in Children: Randomized, Non-Blinded, Crossover Study. *Pediatric Pulmonol* 2011;46:809-816.
-

## *II - Artigo Original*

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



Contents lists available at ScienceDirect

## Respiratory Physiology &amp; Neurobiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/resphysiol](http://www.elsevier.com/locate/resphysiol)

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



Carlos Fernando Ronchi<sup>b,c,d,\*</sup>, Ana Lucia Anjos Ferreira<sup>a</sup>, Fabio Joly Campos<sup>b</sup>,  
Cilmery Suemi Kurokawa<sup>b</sup>, Mario Ferreira Carpi<sup>b</sup>, Marcos Aurélio Moraes<sup>b</sup>,  
Rossano Cesar Bonatto<sup>b</sup>, Kyung-Jin Yeum<sup>c</sup>, Jose Roberto Fioretto<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School – São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pediatrics, Botucatu Medical School – São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

<sup>c</sup> Jean Mayer USDA – Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University, Boston, MA, USA

<sup>d</sup> Department of Health Sciences – Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauri, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

Article history:  
Accepted 15 October 2013

Keywords:  
Conventional mechanical ventilation  
DNA damage  
High-frequency oscillatory ventilation  
Inhaled nitric oxide  
Pulmonary oxidative stress

## ABSTRACT

To compare conventional mechanical ventilation (CMV) and high-frequency oscillatory ventilation (HFOV), with/without inhaled nitric oxide (iNO), for oxygenation, inflammation, antioxidant/oxidative stress status, and DNA damage in a model of acute lung injury (ALI). Lung injury was induced by tracheal infusion of warm saline. Rabbits were ventilated at  $F_{I\text{O}_2}$  1.0 and randomly assigned to one of five groups. Overall antioxidant defense/oxidative stress was assessed by total antioxidant performance assay, and DNA damage by comet assay. Ventilatory and hemodynamic parameters were recorded every 30 min for 4 h. All groups showed worse oxygenation than controls after lung injury. After 4 h of mechanical ventilation, HFOV groups presented significant improvements in oxygenation. HFOV with and without iNO, and CMV with iNO showed significantly increased antioxidant defense and reduced DNA damage than CMV without iNO. Inhaled nitric oxide did not beneficially affect HFOV in relation to antioxidant defense/oxidative stress and pulmonary DNA damage. Overall, lung injury was reduced using HFOV or CMV with iNO.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is characterized by an inflammatory process that causes disruption of the alveolar-capillary barrier leading to interstitial and alveolar edema. There is also an increase in pulmonary vascular resistance, which has a rapid onset and persists even after hypoxia correction (Pluta and Govert, 2008). According to the new Berlin definition, mild hypoxemia is characterized as  $200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{F}_{\text{I}\text{O}_2} \leq 300 \text{ mmHg}$  with  $\text{PEEP}$  or  $\text{CPAP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$ ; moderate hypoxemia as  $100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{F}_{\text{I}\text{O}_2} \leq 200 \text{ mmHg}$  with  $\text{PEEP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$ ; and severe hypoxemia as  $\text{PaO}_2/\text{F}_{\text{I}\text{O}_2} \leq 100 \text{ mmHg}$  with  $\text{PEEP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$  (ARDS: The Berlin definition, 2012).

Although mechanical ventilation (MV) is an important support for patients with ARDS, it can cause additional lung injury (Dahlem et al., 2007) due to the large inspired tidal volume ( $V_T$ ) or high ventilator pressures (Ware and Matthay, 2000). Protective

conventional mechanical ventilation has shown decreased mortality rates in clinical studies (ARDS Network, 2000). High-frequency oscillatory ventilation (HFOV) is considered an attractive ventilatory mode of pulmonary protection (Allardet-Servent et al., 2008; Girard and Bernard, 2007). It uses a lower  $V_T$  (1–3 ml/kg) at a frequency well above normal physiological breathing (5–10 Hz) thus avoiding the larger alveolar pressure and volume excursions typical of conventional mechanical ventilation (CMV). In recent studies, we demonstrated that HFOV improved oxygenation, reduced inflammatory process and histopathological damage, and attenuated oxidative lung injury compared to CMV in an experimental acute lung injury (ALI) model (Ronchi et al., 2011, 2012).

The adjunctive use of inhaled nitric oxide (iNO), a potent endogenous vasodilator (Kohlet, 2003) has potential benefits (Heussel et al., 2003) without causing systemic vasodilation and hypotension (Ichinose et al., 2004). However, its effect on pulmonary inflammatory response is still controversial, showing either increased (Sittipunt et al., 2001) or decreased (Bloomfield et al., 1997) release of inflammatory mediators. Nitric oxide is a reactive molecule produced by nitric oxide synthase (NOS) enzymes in a variety of cells. It is a free oxygen radical that can react with molecules to form toxic chemical compounds in the lung, including peroxynitrite, which damages DNA, induces lipid

\* Corresponding author at: Health Science Department, Universidade do Sagrado Coração - USC, Bauri, SP 17011-180, Brazil. Tel.: +55 14 2107 7000; fax: +55 14 2107 7000.

E-mail address: [ronchi.carlos@yahoo.com](mailto:ronchi.carlos@yahoo.com) (C.F. Ronchi).

peroxidation, and reacts with proteins, leading cellular apoptosis (Crow and Beckman, 1995). Nitric oxide inhibits adhesion molecule expression, inflammatory cytokine and chemokine, such as IL-8, MCP-1, among others (Guzik et al., 2003). Also, it can react with biologic targets directly or indirectly via formation of reactive intermediate products. Under aerobic conditions, the gas reacts with oxygen and superoxide radicals to form nitrogen dioxide and peroxynitrite, respectively. These reactive nitrogen species are capable of causing damage to macromolecules by oxidation of redox-active complexes or nitration of aromatic amines (Sittipunt et al., 2001).

These effects are mainly related to iNO dose, local oxidation–reduction potential, other inflammatory mediators, and oxygen-derived free radicals (Laroux et al., 2001). Our group recently showed that the early use of low dose iNO attenuated oxidative stress, and histopathological and inflammatory lung injury (Fioretto et al., 2012).

Currently, no study has compared the effects of HFOV and CMV together with iNO on lung oxidative stress and DNA damage using total antioxidant performance and comet assay, respectively.

Based on our previous results, we hypothesized that HFOV with iNO attenuates pulmonary oxidative stress in ALI. This study aimed to compare HFOV and CMV, both with and without iNO, for oxygenation, inflammation, histopathology, antioxidant defense, and DNA damage in an ALI model.

## 2. Methods

### 2.1. Design, animals, and instrumentation

A prospective, sham controlled animal study was conducted. Forty male 2.0–3.0 kg Norfolk white rabbits were anesthetized with ketamine (50 mg/kg intramuscularly) and xylazine (2 mg/kg intramuscularly) and instrumented as previously described (Fioretto et al., 2012; Ronchi et al., 2011, 2012). Briefly, rabbits were pre-oxygenated during spontaneous breathing with 100% oxygen by nose catheter. 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. Ventilation was then immediately initiated with a Galileo Gold ventilator (Hamilton Medical AG, Sweden) in pressure-regulated-volume control mode with the following initial parameters:  $F_{I_{O_2}} = 1.0$ ;  $V_T = 6$  ml/kg; PEEP = 5 cmH<sub>2</sub>O; respiratory frequency (fR) = 40–50 breaths/min. These settings were maintained 15 min for stabilization. Once tracheotomy had been performed, a vascular catheter was inserted into the common carotid artery (22 Gauge Jelco, Introcath® Safety™ – B. Braun, Melsungen, Germany), and a double lumen catheter (5<sup>fr</sup> – Arrow International Inc., Reading, Philadelphia, 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, USA) connected to a conventional physiological monitor (Dixtal 2010, Manaus, Brazil). The double lumen catheter was used to provide continuous infusion of sedatives, maintenance fluids, and vasoactive drugs.

Anesthesia was maintained with continuous intravenous infusion of ketamine (10 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 movement. If mean arterial pressure fell below 50 mmHg during the experiment, intravenous noradrenaline infusion (0.5–1 µg/kg/min) was initiated. The need for inotropic support was measured by using a vasoactive-inotropic score (Gaies et al., 2010). Maintenance fluid was provided by 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

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 minimizing discomfort, distress, and pain in accordance with National Institute of Health guidelines. This study was approved by the Experimental Research and Ethics Committee, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University and the Jean Mayer USDA – Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston, USA.

### 2.2. 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 (Fioretto et al., 2012; Ronchi et al., 2011, 2012). After stabilization, an arterial blood gas sample was obtained to verify that animals were hypoxemic (two values of  $P_{a_{O_2}} \leq 200$  mmHg 15 min apart). After the stabilization period, animals were given two 30 s dynamic sustained inflations with a  $P_{aw}$  of 30 cmH<sub>2</sub>O to promote lung recruitment and equalize volume history (McCulloch et al., 1988).

### 2.3. Experimental groups

Animals ( $n = 40$ ) were assigned to one of five groups: (a) sham control [CG,  $n = 8$ ;  $V_T$  6 ml/kg, PEEP 5 cmH<sub>2</sub>O]; (b) ALI + CMV [MVG,  $n = 8$ ;  $V_T$  6 ml/kg, PEEP 10 cmH<sub>2</sub>O, Plateau pressure limited to  $\leq 30$  cmH<sub>2</sub>O]; (c) ALI + CMV + iNO [MVGNO,  $n = 8$ ;  $V_T$  6 ml/kg, PEEP 10 cmH<sub>2</sub>O, iNO 5 ppm, Plateau pressure limited to  $\leq 30$  cmH<sub>2</sub>O, in a Galileo Gold ventilator (Hamilton Medical AG, Sweden)]; (d) ALI + HFOV [HFG,  $n = 8$ ;  $P_{aw}$  12–14 cmH<sub>2</sub>O, respiratory frequency (fR) 10 Hz, inspiratory time 33%, and initial pressure amplitude 20 cmH<sub>2</sub>O]; and (e) ALI + HFOV + iNO [HFGNO,  $n = 8$ ;  $P_{aw}$  12–14 cmH<sub>2</sub>O, fR 10 Hz, inspiratory time 33%, iNO 5 ppm, and initial pressure amplitude 20 cmH<sub>2</sub>O, in a SensorMedics 3100A ventilator (Viasys Healthcare, Yorba Linda, USA)]. In CMV mode, respiratory frequency was maintained at 40–50 breaths/min to reach targeted  $P_{CO_2}$  (40–45 mmHg); pressure amplitude in HFOV was modified to achieve the same  $P_{CO_2}$  level.  $F_{I_{O_2}}$  was maintained at 1.0 throughout the experiment.

Arterial blood gas was obtained before (baseline) and after lung injury induction and every 30 min until 4 h observation was completed; analysis was by an ABL-3 blood gas analyzer (Bayer, Rapid Lab, Khiron 865).

### 2.4. Inhaled nitric oxide administration

Inhaled nitric oxide administration followed previously described guidelines and techniques (Fioretto et al., 2012, 2004). Briefly, NO blended with nitrogen was obtained from 20 L tanks connected to a pressure regulator (White Martins Gases Industriais – Praxair, Rio de Janeiro, Brazil). Tank concentrations were certified by the suppliers as 300 ppm nitric oxide in nitrogen. NO was continuously delivered to the rabbits via flowmeter directly into the inspiratory limb of the ventilator circuit, distal to the humidifier from a point 30 cm distal to the rabbit's tracheal tube. Inhaled nitric oxide and nitric dioxide (NO<sub>2</sub>) concentrations were measured using an electrochemical sensor (JP Moryia Ind & Com Ltd., São Paulo, Brazil) from samples of circuit gas obtained as close as possible to the tracheal tube via a Y-piece. The NO/NO<sub>2</sub> electrochemical sensor was calibrated before use every day. Audio-visual alarms were calibrated at 1 ppm above administered iNO dose and at a maximum NO<sub>2</sub> concentration of 3 ppm. The delivery system was flushed thoroughly before use. In high-frequency oscillatory ventilation, iNO was delivered and monitored using a Pulmonox Mini (Namu, Messer, Griesheim, Austria).

## 2.5. Tissue collection

The right lung was dissected and stored for oxidative stress analysis and the left lung dissected for bronchoalveolar lavage. Tissue specimens for oxidative stress study were snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

## 2.6. Bronchoalveolar lavage

A bronchoalveolar lavage was performed in the left lung twice using 15 ml/kg of normal saline. Bronchoalveolar lavage fluid was collected and total number of cells counted in a hemocytometer chamber. Differential counting was performed by morphological examination using Panotic staining and percentage of polymorphonuclear leukocytes (PMN) assessed.

## 2.7. Total antioxidant performance analysis

Total antioxidant performance assay (TAP) was used to measure antioxidant defense/oxidative stress status of rabbit lung tissue. 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 (Beretta et al., 2006). Liposomes for control were prepared as previously validated and reported by other authors in plasma (Beretta et al., 2006) and animal tissue (Fioretto et al., 2012; Ronchi et al., 2011). Dorsal portion of right lung was weighed (0.4 g), minced, and homogenized for 20 s on ice with 2 ml of phosphate buffered saline (PBS, 100 mM, pH 7.4) using an IKA Ultra-Turrax T8 homogenizer (Wilmington, NC). Aliquots of supernatant were collected after lung tissue homogenate centrifugation at  $800 \times g$  for 15 min in a Sorvall RT 6000 refrigerated centrifuge (Du Pont Co., Newtown, CT) and used for TAP. Protein concentration was determined using the previously described BCA Protein Assay (Beretta et al., 2006).

## 2.8. DNA damage analysis in pulmonary tissue

Endogenous DNA damage was measured in lung tissue cells as previously described by Ronchi et al. (2012).

Briefly, lung tissue (200 mg) was minced and homogenized in cold PBS using a Potter homogenizer (Wheaton Instruments, New Jersey, USA). Cell suspension was collected and left on ice for 10 min, then centrifuged at  $200 \times g$  for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The resulting cell pellet was re-suspended in PBS.

Lung cells were added to low melting point agarose. From the mixtures, 130  $\mu\text{l}$  were layered onto slides pre-coated with normal agarose, covered with a coverslip, and left for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$  for the agarose to solidify. Coverslips were subsequently removed and slides immersed in a lysis solution for 24 h. Slides were then washed with PBS and immersed in a freshly prepared alkaline buffer; after a 40 min DNA unwinding period electrophoresis was performed. Slides were washed in absolute ethanol and stored at room temperature for drying. The slides were stained with SYBRgreen, examined using a fluorescent microscope, and percentage of DNA damage in tail was measured by a computer scoring system. Every step was carried out under indirect light.

## 2.9. Total plasma nitric oxide product determination

Combined nitrate plus nitrite ( $\text{NO}_x$ ) was measured to determine nitric oxide concentration in rabbit plasma, as previously described (Miles et al., 1996) using a Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI).

## 2.10. Statistical analysis

Data were analyzed by SigmaPlot 11 (SPSS, Chicago, IL). 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  $p < 0.05$ .

## 3. Results

There were no statistical differences among groups for weight (CG:  $2.83 \pm 0.29$  = MVG;  $2.62 \pm 0.23$  = MVGNO;  $2.74 \pm 0.32$  = HFG;  $2.50 \pm 0.18$  = HFGNO;  $2.55 \pm 0.21$  kg;  $p > 0.05$ ), number of lung lavages to induce lung injury (MVG:  $7.8 \pm 2.66$  = MVGNO;  $7.4 \pm 1.87$  = HFG;  $7.6 \pm 2.53$  = HFGNO;  $8.2 \pm 2.04$ ;  $p > 0.05$ ), and percentages of fluid recovered from the lavaged lungs (MVG: 86% = MVGNO; 81% = HFG; 87% = HFGNO; 82%;  $p > 0.05$ ).

### 3.1. Hemodynamic, lung mechanics, and gas exchange

Animals from ALI groups required noradrenaline to maintain mean arterial pressure above 50 mmHg. All injured groups had higher vasoactive-inotropic score than CG [CG:  $0 (0-30)$  < MVG:  $50 (0-75)$  = MVGNO:  $50 (0-65)$  = HFG:  $50 (0-60)$  = HFGNO:  $50 (25-75)$ ;  $p < 0.05$ ].

Fig. 1 shows a significant increase in Paw after lung injury induction in all ALI groups compared to CG ( $p < 0.05$ ) lasting until the end of the experiment.

Acute lung injury groups showed significant hypoxemia after lung injury compared to baseline and CG. After 4 h of mechanical ventilation, HFOV groups showed a significant improvement in oxygenation compared to CMV groups, presenting oxygenation indexes similar to baseline and CG. Oxygenation index (OI, mean airway pressure  $\times F_{\text{I}\text{O}_2} \times 100 / \text{Pa}_{\text{O}_2}$ ;  $\text{cmH}_2\text{O}/\text{mmHg}$ ) and  $\text{Pa}_{\text{O}_2}$  values are shown in Fig. 2a and b respectively.

### 3.2. Oxidative injury

#### 3.2.1. Total antioxidant performance

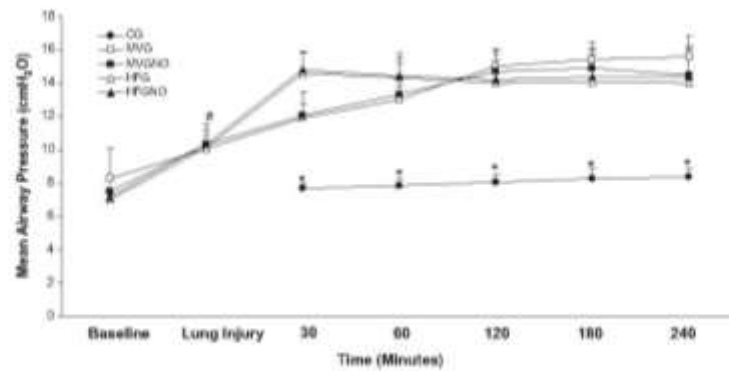
High-frequency oscillatory ventilation groups exhibited TAP in lung tissue comparable to CG and significantly higher than CMV groups, indicating higher protection against oxidative stress in HFOV groups. Although not significant, CMV with iNO showed greater TAP than CMV without iNO (Table 1).

#### 3.2.2. DNA damage analysis in lung tissue

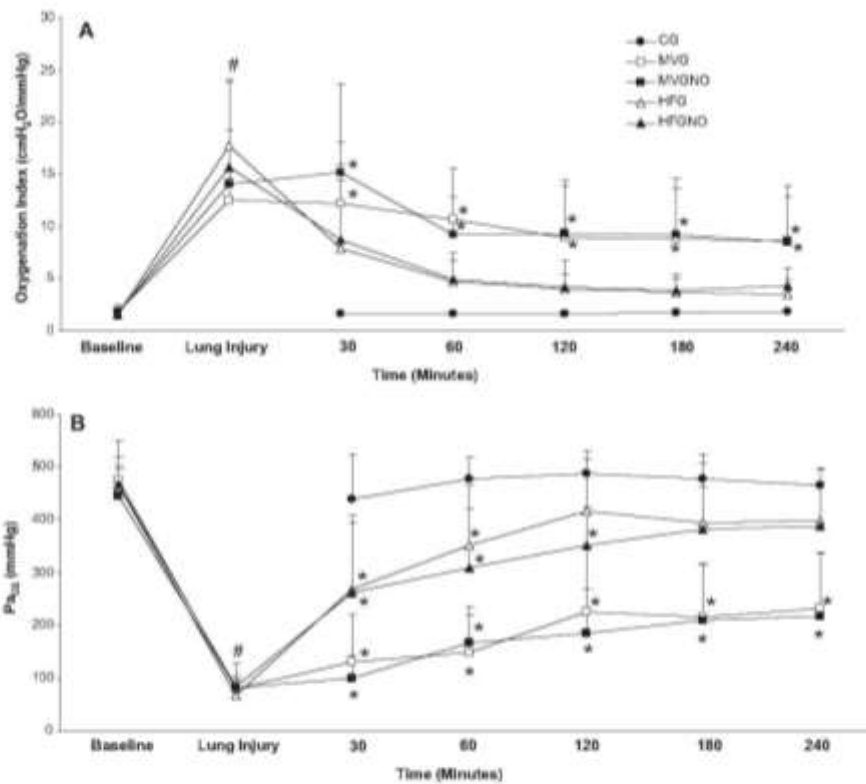
Endogenous DNA damage was significantly higher in animals submitted to CMV without iNO than in CG, HFOV, and CMV with iNO groups (Table 1).

### 3.3. Polymorphonuclear cell count

PMN cells recovered from bronchoalveolar lavage were higher in MVG than HFOV and CMV+iNO groups, which were similar to CG (Table 1).



**Fig. 1.** Mean airway pressure over time for the experimental groups. Data are shown as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ : sham control compared to ALL groups and # $p < 0.05$ : lung injury compared to baseline. Groups: CG, sham control; MVG, conventional mechanical ventilation without inhaled nitric oxide; MVGNO, conventional mechanical ventilation with inhaled nitric oxide; HFG, high-frequency oscillatory ventilation without inhaled nitric oxide; HFGNO, high-frequency oscillatory ventilation with inhaled nitric oxide.



**Fig. 2.** (a) Oxygenation index (mean airway pressure  $\times$   $f_{\text{I}O_2} = 100/Pa_{\text{O}_2}$ ) over time for the experimental groups. Data are shown as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  compared to sham control (CG) and # $p < 0.05$  compared to baseline. (b)  $Pa_{\text{O}_2}$  over time for the experimental groups. Data are shown as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  compared to sham control (CG) and # $p < 0.05$  compared to baseline. Groups: CG, sham control; MVG, conventional mechanical ventilation without inhaled nitric oxide; MVGNO, conventional mechanical ventilation with inhaled nitric oxide; HFG, high-frequency oscillatory ventilation without inhaled nitric oxide; HFGNO, high-frequency oscillatory ventilation with inhaled nitric oxide.

3.4. Total plasma nitric oxide product quantification

There was no difference between groups for plasma NO<sub>x</sub> concentration (Table 1).

4. Discussion

This study corroborates previous findings that HFOV, per se, improves oxygenation and has a protective effect against oxidative

Table 1

Total antioxidant performance (TAP) assay, endogenous DNA damage in lung tissue, number of polymorphonuclear leukocyte (PMN) cells and plasma nitrite/nitrate concentration.

	CG	MVG	MVCNO	HFG	HFGNO
Total antioxidant performance (% protection g/protein)	58.9 ± 4.31	46.9 ± 3.09	55.9 ± 2.40	69.2 ± 5.07*	68.7 ± 4.14*
DNA damage (% DNA in tail)	10.6 ± 2.04*	29.9 ± 3.91	8.75 ± 3.06*	8.65 ± 2.42*	7.10 ± 2.18*
Number of PMN cells × 10 <sup>6</sup> (bronchoalveolar lavage fluid/lung)	0.21 ± 0.17*	4.56 ± 1.82	0.91 ± 0.42*	0.41 ± 0.18*	0.29 ± 0.18*
Plasma nitrite/nitrate concentration (µmol/mL)	3.54 ± 0.51	4.44 ± 0.96	8.71 ± 1.96	6.14 ± 1.30	6.17 ± 1.22

Data are shown as mean ± SD. \*p < 0.05 comparing groups to the protective conventional mechanical ventilation group (MVG). One-way analysis of variance (Student–Newman–Keuls test). Groups: CG, sham control; MVG, conventional mechanical ventilation without inhaled nitric oxide; MVCNO, conventional mechanical ventilation with inhaled nitric oxide; HFG, high-frequency oscillatory ventilation without inhaled nitric oxide; HFGNO, high-frequency oscillatory ventilation with inhaled nitric oxide.

stress and inflammatory lung injury. Also, the effects of HFOV were not improved by the addition of iNO. Conventional mechanical ventilation was related to better oxygenation and reduced pulmonary DNA damage when used with iNO.

To the best of our knowledge this is the first study that has associated HFOV with iNO and evaluated DNA damage in lung tissue by Comet assay. We previously showed by TAP assay that HFOV had an important protective role against oxidative lung injury in experimental ALI (Ronchi et al., 2011). In fact, HFOV has consistently shown beneficial results in clinical and experimental ARDS (Imai et al., 2001; Mehta et al., 2004; Rotta et al., 2001). In accordance with previous reports, our study confirmed that HFOV improved oxygenation and reduced inflammatory injury (Mehta et al., 2004; Rotta et al., 2001).

Inhaled nitric oxide improves arterial oxygenation in patients with ARDS by decreasing intrapulmonary shunt and pulmonary arterial pressure (Rossaint et al., 1993). Administered in low concentrations and under continuous monitoring, iNO is a safe therapeutic option for treating pulmonary hypertension (Rossaint, 1994). Fioreto et al. (2004) found acutely improved oxygenation indexes over CMV alone when iNO was administered as early as 1.5 h after diagnosis with CMV in ARDS children. Prolonged treatment was also associated with improved oxygenation, thus  $\dot{V}_{O_2}$  and peak inspiratory pressure could be quickly and significantly reduced.

Other investigators have suggested that iNO may lead to decreases in the inflammatory process. Razavi et al. (2002), assessing the effects of iNO on pulmonary inflammation in a sepsis-induced ALI mouse model, demonstrated that early iNO exposure was associated with reduced pulmonary leukocyte infiltration and less oxidative injury assessed by measuring 8-isoprostane. Weigand et al. (2000) analyzed pulmonary lipid peroxidation by malondialdehyde, hexanal, and pentanal in ARDS patients. They showed that malondialdehyde, hexanal, and pentanal were significantly elevated, indicating pulmonary lipid peroxidation. Nevertheless, blood concentrations of these lipid peroxidation products were not affected by therapy with iNO for 24 h.

It seems that response to iNO is better in patients with more severe respiratory failure (Dobyns et al., 1999) and when it is administered soon after ARDS diagnosis (Fioreto et al., 2004). These results point to early low-dose iNO to attenuate lung inflammation. In agreement, Chollet-Martin et al. (1996) showed that iNO reduced lung inflammation in ARDS reflected by PMN activation status and IL-8/IL-6 release. Additionally, another study from our group comparing CMV with and without iNO, showed that early low-dose iNO administration attenuated oxidative stress, and histopathological and inflammatory injuries (Fioreto et al., 2012).

It was interesting to note that iNO had no impact when associated with HFOV in our model. However, when delivered during CMV soon after lung injury, DNA damage was significantly reduced in comparison to CMV without iNO. Although not significant, TAP assay showed a greater antioxidant capacity in MVCNO lung tissue. Therefore, since ARDS patients are submitted to mechanical

ventilation treatment for longer periods in intensive care units, more studies are required to evaluate the mechanisms of pulmonary oxidative damage in patient plasma using the TAP assay and different ventilation strategies. This knowledge would provide a better understanding regarding the physiological antioxidant protection against oxidative stress in ARDS. The fact that iNO had no effect when associated with HFOV may be due to the protective effect of this ventilator strategy in ALI treatment, which per se avoids larger alveolar pressure and volume excursions, thus reducing lung injury. However, when associated with CMV, the effects of iNO could be clearly seen.

These findings could be also 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. Rabbits, for instance, have a 57% similarity with the human TLR4 hypervariable region, and are associated with moderate nitric oxide production. Differently, rat and mouse have a high nitric oxide production, which is discrete in humans and primates (Matute-Bello et al., 2008).

Currently, one of the most common used animal ALI models is alveolar lavage with warmed normal saline. This is primarily a surfactant depletion model, which causes a lung injury very similar to human ARDS in its effects on oxygenation, pulmonary compliance, atelectasis, and edema perivascular/peribronchial. However, it induces less macrophage and neutrophil infiltration, unless another injury such as mechanical ventilation is added (Matute-Bello et al., 2008).

Regarding iNO dose, it is recommended that patients are maintained on the lowest dose, which is associated with a positive response in oxygenation [an increase greater than or equal to 10 mmHg in the  $P_{aO_2}/F_{iO_2}$  ratio] (Cuthbertson et al., 1997; Fioreto, 2003). Previously, in clinical studies from our group, the lowest iNO dose (5 ppm) was administered for the shortest period to decrease potential toxic effects related to methemoglobin and nitrogen dioxide. The same principle was used in the present experimental study, that is, we have used the same dose delivered to the patients. Besides, we tried to use the same dose that was used in previous studies to make them comparable (Fioreto et al., 2011, 2004).

#### 4.1. Future implications

Firstly, in view of the complexity of ARDS pathophysiology, finding a single therapy to manage this syndrome will be difficult. Further studies of its mechanisms should be made in an effort to improve outcome. In this sense, the TAP and Comet assays should be used to evaluate antioxidant capacity and oxidative stress in patients, as we have already demonstrated that they can identify oxidative stress in this experimental ALI model (Ronchi et al., 2012). Secondly, antioxidant supplements could be an important tool in treating these patients, lessening lung injury from oxidative stress. We have also shown correlation between peripheral blood

and target tissue for these oxidative stress biomarkers, suggesting that peripheral blood could be used for large epidemiological studies conducted in intensive care clinical practice, when target tissue is not available.

**5. Conclusion**

Inhaled nitric oxide did not add beneficial effects to HFOV in relation to antioxidant defense/oxidative stress and pulmonary DNA damage. Overall, lung injury was reduced using HFOV or protective CMV plus iNO.

**Conflict of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest.

**Acknowledgments**

Supported in part by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), 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: 58-1950-7-07. Any opinions, findings, conclusion, or recommendations expressed in this publication are those of the author(s) and do not necessarily reflect the view of UNESP or the U.S. Dept. of Agriculture. We thank the entire staff of the Clinical and Experimental Laboratory of the Pediatrics Department-UNESP and the Experimental Laboratory of Tufts University for their assistance and Colin E. Knaggs for text revision.

**References**

Acute Respiratory Distress Syndrome Network. 2000. 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*. 342, 1301-1308.

ARDS. 2012. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition. *J Am Med Assoc*. 307, 2526-2533.

Allardet-Servent J, Bregon F, Delpierre S, Steinberg JG, Pagan MJ, Ravallin S, Papanian L. 2008. High-frequency percussive ventilation attenuates lung injury in a rabbit model of gastric juice aspiration. *Intensive Care Med*. 34, 91-100.

Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russell RM, Kinsky M, Yeum KJ. 2006. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem*. 354, 290-298.

Bloomfield GL, Hoffsway S, Ridings PC, Fisher BJ, Hodder CR, Stolley M, Busch T, Sugarman HJ, Fowler AA. 1997. Pretreatment with inhaled nitric oxide inhibits neutrophil migration and oxidative activity resulting in attenuated sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care Med*. 25, 584-593.

Chollet-Martin S, Gatacci C, Kermarrec H, Gougeon-Pocitalo MA, Payen DM. 1996. Alveolar neutrophil functions and cytokine levels in patients with the adult respiratory distress syndrome during nitric oxide inhalation. *Am J Respir Crit Care Med*. 153, 985-990.

Crow JP, Beckman JS. 1995. The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 196, 57-73.

Cuthbertson BH, Dellinger P, Dyer OJ, Evans TE, Higginsbottom T, Latimer R, Payne D, Stott SA, Webster NR, Young JD. 1997. UK guidelines for the use of inhaled nitric oxide therapy in adult ICUs. American-European Consensus Conference on ALI/ARDS. *Intensive Care Med*. 22, 1212-1218.

Dahlens P, Van Aalderen WM, Bos AP. 2007. Pediatric acute lung injury. *Pediatr Respr Rev*. 8, 248-262.

Dobyns EL, Cornfield DN, Anas NG, Fortenberry JD, Tasker RC, Lynch A, Liu F, Felts PL, Grubel J, Raec M, Kinzella JP, Ahman SH. 1999. Multicenter randomized controlled trial of the effects of inhaled nitric oxide therapy on gas exchange in children with acute hypoxic respiratory failure. *J Pediatr*. 134, 406-412.

Fiochetto JR. 2003. Inhaled nitric oxide in pediatrics. *J Pediatr*. 79, 177-186.

Fiochetto JR, Batista KA, Carpi MF, Bonatto RC, Moraes MA, Ricchetti SM, Rattella RF. 2011. High frequency oscillatory ventilation associated with inhaled nitric oxide compared to pressure-controlled assist/control ventilation and inhaled nitric oxide in children: randomized, non-blinded, crossover study. *Pediatr Pulmonol*. 46, 829-836.

Fiochetto JR, Campos FJ, Ronchi CF, Ferreira AL, Kurokawa CS, Carpi MF, Moraes MA, Bonatto RC, Defaveri J, Yeum KJ. 2012. 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*. 57, 273-281.

Fiochetto JR, Moraes MA, Bonatto RC, Ricchetti SM, Carpi MF. 2004. Acute and sustained effects of early administration of inhaled nitric oxide to children with acute respiratory distress syndrome. *Pediatr Crit Care Med*. 5, 469-474.

Gales MG, Gurney JG, Yen AH, Napoli ML, Gajarski RJ, Obye RG, Charpie JR, Hirsch JC. 2010. Vasoactive-inotropic score as a predictor of morbidity and mortality in infants after cardiopulmonary bypass. *Pediatr Crit Care Med*. 11, 224-228.

Grard TD, Bernard GR. 2007. Mechanical ventilation in ARDS: a state-of-the-art review. *Chest*. 131, 921-929.

Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*. 54, 460-487.

Heussel CP, Scholz A, Schmittner M, Laukamp-Ostendorf S, Schreiber WG, Ley S, Quintel M, Weiler N, Thelen M, Kauczor HU. 2003. Measurements of alveolar pO2 using 19F-MRI in partial liquid ventilation. *Invest Radiol*. 38, 625-641.

Ichinose F, Roberts Jr JD, Zapol WM. 2004. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential. *Circulation*. 109, 1106-1111.

Imai Y, Nakagawa S, Ito Y, Kawano T, Shitky AS, Miyazaki K. 2001. Comparison of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation. *J Appl Physiol*. 91, 1836-1844.

Kohler D. 2003. Nitric oxide inhalation and high frequency oscillatory ventilation for hypoxic respiratory failure in infants. *Int Med Assoc J*. 5, 19-23.

Laroux FS, Pavlick KP, Hines LN, Kawachi S, Harada R, Bharwani S, Hoffman JM, Grisham MB. 2001. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol Scand*. 173, 113-118.

Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. 2008. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295, 379-389.

McNulch P, Forkert PG, Froese AB. 1998. Lung volume maintenance prevents lung injury during high frequency oscillatory ventilation in surfactant deficient rabbits. *Am Rev Respir Dis*. 157, 1185-1190.

Melisa S, Granton J, Macdonald RJ, Bowman D, Matte-Martyn A, Bachman T, Smith T, Stewart TE. 2004. High-frequency oscillatory ventilation in adults: the Toronto experience. *Chest*. 126, 518-527.

Miles AM, Wink DA, Cook JC, Grisham MB. 1996. Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymol*. 268, 105-120.

Plua GC, Govert J. 2008. Mechanical ventilation in an airborne epidemic. *Clin Chest Med*. 29, 323-329.

Razavi HM, Werhann R, Scott JA, Weicker S, Wang Le F, McCormack DG, Mehta S. 2002. Effects of inhaled nitric oxide in a mouse model of sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care Med*. 30, 868-873.

Ronchi CF, Ferreira AL, Campos FJ, Kurokawa CS, Carpi MF, Moraes MA, Bonatto RC, Defaveri J, Yeum KJ, Fiochetto JR. 2011. High-frequency oscillatory ventilation attenuates oxidative lung injury in a rabbit model of acute lung injury. *Exp Biol Med*. 236, 1188-1196.

Ronchi CF, Fiochetto JR, Ferreira AL, Berchieri-Ronchi CB, Correa CR, Kurokawa CS, Carpi MF, Moraes MA, Yeum KJ. 2012. Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury induced in rabbits submitted to different strategies of mechanical ventilation. *J Appl Physiol*. 112, 1184-1190.

Rossaint R. 1994. Nitric oxide: a new area in intensive care. *Praxis Med*. 23, 855-858.

Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Phon U, Zapol WM. 1993. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 328, 375-382.

Rotta AT, Gunnarsson R, Fuhrman BP, Hernan LJ, Steinhorn DM. 2001. Comparison of lung protective ventilation strategies in a rabbit model of acute lung injury. *Crit Care Med*. 29, 7176-7184.

Simpson C, Steinberg KP, Suzuki JT, Myles C, Zhu S, Goodman RB, Hudson LD, Matalon S, Martin TR. 2001. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 163, 501-510.

Ware LB, Matthay MA. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 342, 1334-1349.

Weigand MA, Snyder-Ramos SA, Mollers AG, Baur J, Hansen D, Kochen W, Martin E, Motsch J. 2000. Inhaled nitric oxide does not enhance lipid peroxidation in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 28, 3429-3435.

### *III - Artigo Publicado*

*Interação entre efeitos da ventilação mecânica, óxido nítrico inalatório e estresse oxidativo em lesão pulmonar aguda*

Interação entre efeitos da ventilação mecânica , óxido nítrico inalatório e estresse oxidativo em lesão pulmonar aguda

Carlos Fernando Ronchi<sup>1a, 2\*</sup>; Ana Lucia dos Anjos Ferreira<sup>1a</sup>; Fabio Joly Campos<sup>1b</sup>; Cilmary Suemi Kurokawa<sup>1b</sup>; Mario Ferreira Carpi<sup>1b</sup>; Aurélio Marcos de Moraes<sup>1b</sup>; Rossano Cesar Bonatto<sup>1b</sup>; Kyung-Jin Yeum<sup>2</sup>; Jose Roberto Fioretto<sup>1b</sup>.

Respiratory Physiology and Neurobiology 190 (2014) 118-123

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu;  
<sup>1a</sup>Departamento de Medicina Interna; <sup>1b</sup>Departamento de pediatria; <sup>2</sup>Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University.

---

## RESUMO

Comparar ventilação mecânica convencional (VMC) e ventilação oscilatória de alta frequência (VOAF), com e sem óxido nítrico inalatório ( $\text{NO}_i$ ), quanto a oxigenação, inflamação, estresse oxidativo e dano no DNA em modelo de lesão pulmonar aguda (LPA). A lesão pulmonar foi induzida por meio de infusão traqueal de solução salina aquecida. Os coelhos foram ventilados com  $\text{FiO}_2$  1.0 e randomizados em cinco grupos. O estresse oxidativo foi medido pela capacidade antioxidante total e o dano no DNA, pelo teste do cometa. Parâmetros ventilatórios e hemodinâmicos foram registradas a cada 30 minutos por quatro horas. Os grupos com LPA mostraram pior oxigenação que o grupo controle. Após 4 horas de ventilação mecânica, o grupo VOAF apresentou significativa melhora na oxigenação. Os grupos VOAF, com e sem  $\text{NO}_i$ , e o grupo VMC com  $\text{NO}_i$  mostraram aumento significativo da capacidade antioxidante e redução no dano no DNA quando comparado ao grupo VMC sem  $\text{NO}_i$ . O óxido nítrico inalatório não beneficiou adicionalmente o grupo VOAF em relação ao estresse oxidativo e ao dano ao DNA. De forma geral, a lesão pulmonar foi reduzida quer seja utilizando VMC ou VOAF com  $\text{NO}_i$ .

---

## 1. INTRODUÇÃO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é caracterizada por processo inflamatório que causa ruptura da barreira alvéolo-capilar levando a edema alveolar e intersticial. Há aumento da resistência vascular pulmonar de instalação rápida e que persiste mesmo após a correção da hipóxia (Phua & Govert, 2008). De acordo com a Definição de Berlim, hipoxemia leve é caracterizada por  $200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300 \text{ mmHg}$ , moderada  $100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200 \text{ mmHg}$  e grave  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100 \text{ mmHg}$  (SDRA: Definição de Berlim, 2012).

Apesar da ventilação mecânica (VM) ser importante medida de suporte nos pacientes com SDRA, ela pode levar a dano pulmonar adicional (Dahlem et al., 2007) devido a utilização de volume corrente inspirado alto ( $V_t$ ) ou de pressões de inspiratórias elevadas (Ware and Matthay, 2000). A VM protetora mostrou diminuição na taxa de mortalidade em estudos clínicos (ARDS Network, 2000). A ventilação oscilatória de alta frequência (VOAF) é considerada um modo ventilatório não convencional protetor atraente (Allerdet-Servent et al., 2008; Girard and Bernard, 2007). Ela utiliza baixo volume corrente (1-3 mL/kg) com frequência respiratória muito acima da fisiológica (5-10Hz), evitando, assim, altas oscilações de pressões e de volume alveolares, típicas da ventilação mecânica convencional (VMC). Recentemente, demonstramos que a VOAF melhora oxigenação e reduz o processo inflamatório e a lesão histopatológica e atenua a lesão pulmonar oxidativa quando comparada a VMC em modelo experimental de lesão pulmonar (Ronchi et al., 2011, 2012).

A utilização de óxido nítrico inalatório (NOi), um potente vasodilatador endógeno (Kohlet, 2003) apresenta benefício potencial (Heussel et al., 2003) sem causar vasodilatação sistêmica e hipotensão (Ichinose et al., 2004). Entretanto, seu efeito na resposta inflamatória pulmonar permanece controverso, mostrando tanto aumento (Sittipunt et al., 2001) quanto diminuição (Bloomfield

et al., 1997) na liberação de mediadores inflamatórios. O óxido nítrico é uma molécula reativa produzida pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) em uma variedade de células. É um radical livre que pode reagir com outras moléculas para formar compostos químicos tóxicos no pulmão, incluindo peroxinitrito, que lesa o DNA, induz peroxidação lipídica e reage com proteínas, levando a apoptose celular (Crow and Beckman, 1995). O óxido nítrico inibe a expressão das moléculas de adesão, citocinas e quimocinas, como a IL-8, MCP-1, entre outras (Guzik et al., 2003). Além disso pode reagir com alvos biológicos direta ou indiretamente via produtos reativos intermediários. Em condições aeróbicas, o gás reage com oxigênio e radicais superóxidos para formar dióxido de nitrogênio e peroxinitrito, respectivamente. Estas espécies reativas de nitrogênio são capazes de causar danos nas macromoléculas por oxidação dos complexos redox – ativos ou por nitração de aminas aromáticas (Sittipunt et al., 2001).

Estes efeitos são relacionados a dose de NO<sub>i</sub>, potencial local de oxidação/redução, outros mediadores inflamatórios e radicais livres derivados do oxigênio (Laroux et al., 2001). Nosso grupo recentemente mostrou que o uso de baixa dose de NO<sub>i</sub> atenua estresse oxidativo e lesão pulmonar histológica e inflamatória (Fioretto et al., 2012).

Até o momento nenhum estudo comparou os efeitos da VOAF e VMC com o NO<sub>i</sub> sobre o estresse oxidativo pulmonar e quanto ao dano ao DNA utilizando a capacidade antioxidante total e o teste do cometa, respectivamente.

Baseado em nossos estudos prévios nossa hipótese é que a VOAF associada ao NO<sub>i</sub> atenua o estresse oxidativo em lesão pulmonar aguda. Este estudo tem como objetivo comparar a VOAF e a VMC, com e sem NO<sub>i</sub>, quanto a oxigenação, inflamação, histopatologia, defesa antioxidante e dano ao DNA em um modelo de lesão pulmonar aguda.

---

## 2.MÉTODOS

### 2.1 Desenho, animais e instrumentação

Foi conduzido estudo prospectivo e *sham* controlado. Quarenta coelhos machos com peso entre 2,0 e 3,0 kg, brancos e da raça Norfolk foram anestesiados com cetamina (50mg/kg intramuscular) e xilazina (2mg/kg intramuscular) e instrumentados conforme descrito previamente (Fioretto et al., 2012; Ronchi et al., 2011, 2012). Brevemente, os coelhos foram pré oxigenados durante respiração espontânea com oxigênio a 100% por cateter nasal. Foi realizada traqueostomia com inserção de tubo traqueal (3,0-3,5 mm de diâmetro interno; Portex, Hythe, Reino Unido), sendo a posição assegurada com fita umbilical. A ventilação foi imediatamente iniciada com o ventilador *Galileo Gold* (Hamilton Medical AG, Suécia) na modalidade controlada a volume com pressão regulada com os seguintes parâmetros iniciais:  $FiO_2 = 1.0$ ;  $VC=6mL/kg$ ;  $PEEP=5cmH_2O$ ; frequência respiratória=40-50 resp/min. Estes ajustes foram mantidos por 15 minutos para estabilização. Assim que a traqueostomia foi realizada, um cateter vascular foi introduzido na artéria carótida comum (22 Gauge jelco, Introcán<sup>R</sup> Safety<sup>TM</sup>- B Braun, Melsungen, Alemanha) e um cateter de duplo lúmen (5<sup>Fr</sup> – Arrow International Inc. Reading, Filadélfia, EUA) foi introduzido pela veia jugular até a veia cava superior. O cateter arterial foi usado para análise de gases no sangue e monitoração da pressão arterial com monitor convencional (Dixtal 2010, Manaus, Brasil). O cateter de duplo lúmen foi usado para administrar sedativos, fluidos de manutenção e drogas vasoativas.

A anestesia foi mantida por infusão contínua de cetamina (10mg/kg/h). Paralisia muscular foi induzida pela administração intravenosa de brometo de pancurônio (0,2mg/kg) e mantida com doses de 0,1 mg/kg. Se a pressão arterial média ficasse menor que 50 mmHg durante o experimento iniciava-se infusão de noradrenalina (0,5 - 1 mcg/kg/min). A necessidade de suporte inotrópico foi medida utilizando um escore para necessidade de drogas vasoativas (Gaies et

---

al.,2010). A manutenção de fluidos foi realizada por infusão contínua de salina a 0,9% contendo 5% de dextrose a 4 mL/kg/h. A temperatura corpórea foi medida por sonda esofágica e mantida entre 38-39°C com manta térmica. Oximetria de pulso contínua foi realizada colocando sensor em uma porção tricotomizada da perna.

Os coelhos foram mantidos minimizando o desconforto, sofrimento e dor de acordo com as orientações do Instituto Nacional de Saúde. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa experimental, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista e do Jean Mayer USDA – *Human Nutrition Research Center on Aging da Tufts University*, Boston, EUA.

## **2.2 Indução da lesão pulmonar**

A lesão pulmonar foi induzida por meio de lavagem pulmonar com alíquotas de 30 mL/kg de salina 0,9% aquecida (38°C) conforme descrito previamente (Fioretto et al.,2012; Ronchi et al. , 2011,2012). Após a estabilização, obtinha-se amostra de sangue arterial para verificar se o animal estava hipoxêmico (dois valores de  $PaO_2/FiO_2 < 200$  com intervalo de 15 minutos). Após período de estabilização, os animais recebiam uma insuflação sustentada com pressão média de via aérea de 30 cmH<sub>2</sub>O para promover recrutamento alveolar e equalizar o volume (McCulloch et al.,1998).

## **2.3 Grupos Experimentais**

Os animais (n=40) foram alocados para um de cinco grupos: a) grupo controle [GC, n=8: VC 6 mL/kg, PEEP 5 cmH<sub>2</sub>O]; b) LPA+VMC [GVM, n=8: VC 6mL/kg, PEEP 10 cmH<sub>2</sub>O, pressão de platô limitada em 30 cmH<sub>2</sub>O]; c) LPA+VMC+NOi [GVMNO, n = 8: VC 6 mL/kg, PEEP 10 cmH<sub>2</sub>O, NOi 5 ppm, pressão de platô limitada em 30 cmH<sub>2</sub>O, no aparelho *Galileo Gold* (Hamilton Medical AG, Suécia)]; d) LPA+VOAF [GVAF, n=8: Paw 12-14cmH<sub>2</sub>O,

---

frequência respiratória (FR) 10Hz, tempo inspiratório de 33% , amplitude 20 cmH<sub>2</sub>O] e e) LPA+VOAF+NOi [GVAFNO, n=8: Paw 12-14cmH<sub>2</sub>O, FR 10Hz, tempo inspiratório de 33%, amplitude 20 cmH<sub>2</sub>O, NOi 5 ppm, no aparelho SensorMedic 3100A (Viasys Healthcare, Yorba Linda, EUA)]. Na VMC a frequência respiratória foi mantida entre 40-50 resp/min para manter a PaCO<sub>2</sub> desejada (40-45 mmHg); na VOAF a pressão de amplitude foi modificada para manter o mesmo nível de PaCO<sub>2</sub>. A FiO<sub>2</sub> foi mantida em 1.0 durante todo o experimento para todos os grupos.

A coleta de sangue arterial foi obtida antes (linha de base) e depois da indução da lesão pulmonar e a cada 30 minutos pelas 4 horas de observação; A análise foi feita analisador de gás ABL-3 (Bayer,Rapid Lab, Khiron 865).

#### **2.4 Administração de óxido nítrico inalatório**

A administração de NOi foi efetuada conforme descrição prévia (Fioretto et al.,2012,2004). Brevemente, a mistura de NO e nitrogênio foi obtida de tanques de 20L conectados à regulador de pressão (White Martins Gases industriais- Praxair, Rio de Janeiro, Brasil). A concentração do tanque foi certificada pelo fornecedor como 300ppm em nitrogênio. O NO foi administrado de forma contínua aos coelhos via fluxometro no ramo inspiratório do circuito do respirador, distante 30 cm do tubo traqueal do animal. As concentrações de óxido nítrico e de dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) foram medidas usando um sensor eletroquímico (JP Moryia Ind & Com Ltda, São Paulo, Brasil) de amostras do gás obtido no circuito o mais próximo possível do tubo traqueal via um conector em Y. O sensor eletroquímico de NO/NO<sub>2</sub> foi calibrado diariamente antes do uso. Os alarmes audiovisuais foram calibrados 1 ppm abaixo da dose administrada de NOi e a um máximo de NO<sub>2</sub> de 3 ppm. O sistema de administração foi limpo antes do uso. Na ventilação oscilatória de alta frequência o NOi foi administrado e mensurado com o uso do Pulmonox Mini (Namu, Messer, Griesheim, Áustria).

---

## 2.5 Coleta de tecidos

O pulmão direito foi dissecado e estocado para análise do estresse oxidativo e o pulmão esquerdo dissecado para lavado broncoalveolar. Amostras de tecido para estudo do estresse oxidativo foram congeladas em nitrogênio líquido a 80 °C até a análise.

## 2.6 Lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar foi obtido a partir de duas lavagens do pulmão esquerdo utilizando-se 15 mL/kg de solução salina. O fluido do lavado broncoalveolar foi coletado e o número total de células contado em um hemocítmetro de câmara. A contagem diferencial foi feita por meio da análise morfológica com quite de coloração Panotic, sendo avaliada a porcentagem de polimorfonucleares.

## 2.7 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total (TAP) foi utilizada para avaliar o estado da defesa antioxidante/estresse oxidativo dos pulmões dos coelhos. A TAP foi quantificada comparando a área sob a curva relativa à cinética de oxidação da suspensão de controle lipossomal da fosfatidilcolina usada como referência da matriz biológica (Beretta et al., 2006). Lipossomas para controle foram preparados conforme validação e relatos prévios de outros autores no plasma (Beretta et al, 2006) e nos tecidos animais (Fioretto et al., 2012; Ronchi et al., 2011). Uma porção dorsal do pulmão foi pesado (0.4g), macerado e homogeneizado por 20 s em gelo com 2 mL de tampão salina de fosfato (PBS, 100 mM, pH 7.4) usando um IKA, *homogeinizador Ultra-Turrax T8* (Wilmington, NC). Alíquotas do sobrenadante foram coletadas após centrifugação e foi realizada homogeneização do tecido pulmonar a 800/g por 15 minutos em uma centrífuga refrigerada Sorvall RT 6000 (Du pont Co., Newtown,

---

CT) e usada para medida da TAP. A concentração de proteínas foi determinada usando o ensaio BCA descrito previamente (Beretta et al., 2006).

### **2.8 Análise do dano ao DNA no tecido pulmonar**

O dano do DNA endógeno foi medido em células do tecido pulmonar conforme descrito previamente por Ronchi et al. (2012). Brevemente, o tecido pulmonar (200 mg) foi macerado e homogeneizado em PSB frio usando um homogenizador Potter (Wheaton instruments, New Jersey, EUA). A suspensão de células foi coletada e levada ao gelo por 10 min, depois centrifugada a 200/g por 5 minutos a 4°C em agarose para solidificar. As células foram removidas e as porções imersas em solução de lise por 24h. As porções foram então lavadas com PBS e imersas em um preparado tampão alcalino; após 40 minutos, realizou-se a separação do DNA por eletroforese. As porções foram lavadas em etanol absoluto e estocadas para secagem. As porções foram coradas com *SYBRgreen*, examinadas usando um microscópio fluorescente e a porcentagem de dano no DNA calculada por um escore computadorizado. A passagem de um passo a outro foi realizada sempre sob luz indireta.

### **2.9 Determinação dos produtos do óxido nítrico no plasma**

A combinação de nitrato e nitrito (NOx) foi medida para determinar a concentração de óxido nítrico no plasma dos coelhos como descrito previamente (Miles et al., 1996) utilizando um quite de ensaio fluorimétrico para Nitrato/Nitrito (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI).

### **2.10 Análise estatística**

Os dados foram analisados no SigmaPlot 11 (SPSS, Chicago, IL). Dados que apresentaram distribuição normal tiveram as diferenças comparadas pela

---

análise de variância de uma via e por comparação entre os pares (teste de Student-Newman-Keuls) e expressos como média  $\pm$  SD. Dados com distribuição não normal foram comparados por Kruskal-Wallis e a comparação entre os pares pelo teste de Dunn, sendo os dados expressos como mediana (variação). A comparação dos grupos em diferentes momentos foi feita pela medida de análises repetidas de Friedman e a comparação entre os pares pelo método de Dunnett. Tabelas categóricas de contingência foram comparadas pelo teste exato de Fisher. Significância estatística foi definida como  $p < 0,05$ .

---

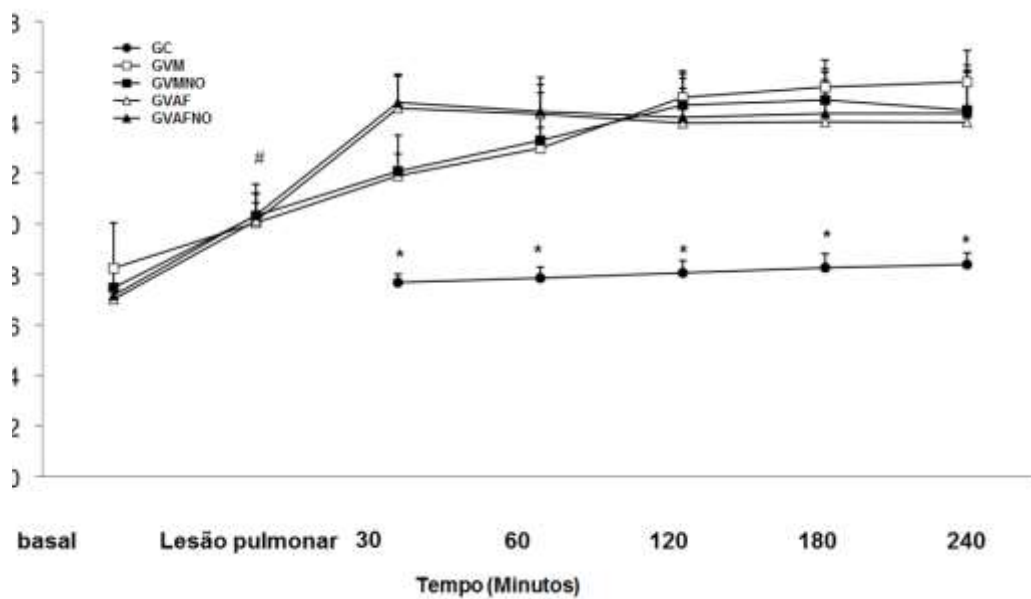
### 3. RESULTADOS

Não houve diferença estatística entre os grupos quanto ao peso (GC:2,83±0,29=GVM:2,62±0,23=GVMNO:2,74±0,32=GVAF:2,50±0,18=GVAFNO: 2,55±0,21 kg;  $p>0,05$ ), número de lavagens pulmonar para induzir lesão pulmonar ( GVM:7,8±2,66= GVMNO:7,4±1,87= GVAF:7,6±2,53=GVAFNO:8,2±2,04;  $p>0,05$ ) e porcentagem de fluido recuperado após lavagem pulmonar (GVM:86%=GVMNO: 81% =GVAF: 87% =GVAFNO: 82%;  $p>0,05$ ).

#### 3.1 Hemodinâmica, mecânica pulmonar e troca gasosa

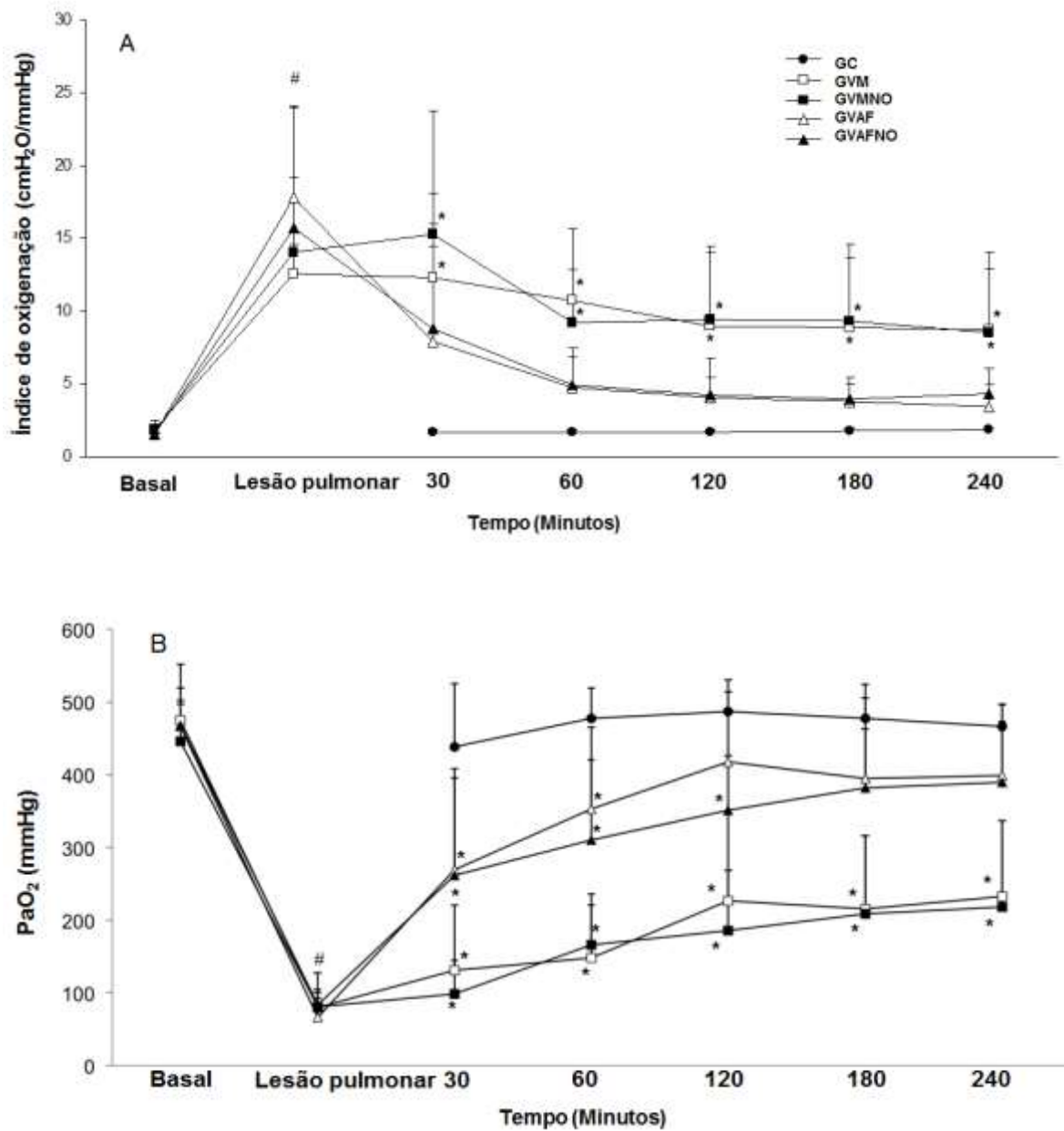
Os animais dos grupos LPA necessitaram de noradrenalina para manter a pressão arterial média acima de 50 mmHg. Todos os grupos com lesão apresentaram escore inotrópico/vasoativo maior que o GC [GC: 0 (0-30)< GVM: 50 (0-75)=GVMNO: 50 (0-65)=GVAF: 50 (0-60)=GVAFNO: 50 (25-75);  $p<0,05$ ]. A figura 1 mostra que houve aumento significativo da pressão de vias aéreas após a indução da lesão pulmonar em todos os grupos LPA comparado ao GC ( $p<0,05$ ) assim permanecendo até o fim do experimento.

---



**Figura 1.** Pressão média da via aérea em relação ao tempo para os grupos. Dados são mostrados com média±DP. \* $p < 0,05$ : comparação do grupo controle com os grupos com lesão pulmonar. # $p < 0,05$ : lesão pulmonar comparada com basal. Grupo GC, grupo controle; GVM ventilação mecânica convencional sem NOi; GVMNO ventilação mecânica convencional com NOi; GVAF ventilação oscilatória de alta frequência sem NOi; GVAFNO ventilação oscilatória de alta frequência com NOi.

Grupos com lesão pulmonar aguda mostraram hipoxemia significativa após a lesão pulmonar quando comparado à linha de base e ao GC. Após 4h de ventilação mecânica, os grupos GVAF mostraram aumento significativo da oxigenação comparado aos grupos GVM, apresentando índice de oxigenação similar ao da linha de base e ao GC. Os valores do Índice de oxigenação ( IO, pressão média de vias aéreas  $\times$   $FiO_2 \times 100/PaO_2$ ; cmH<sub>2</sub>O/mmHg) e da PaO<sub>2</sub> e são mostrados nas figuras 2A e 2B, respectivamente.



**Figura 2.** (A) Índice de oxigenação (pressão média de vias aéreas x FiO<sub>2</sub> x100 / PaO<sub>2</sub>) pelo tempo nos grupos. Dados são mostrados com média±DP. \*p<0,05 comparando ao grupo controle e #p<0,05 comparando com basal. (B) PaO<sub>2</sub> sobre tempo nos grupos. Dados são mostrados com média±DP. \*p<0,05 comparando ao grupo controle e #p<0,05 comparando com basal. Grupo GC, grupo controle; GVM ventilação mecânica convencional sem NOi; GVMNO ventilação mecânica convencional com NOi; GVAF ventilação oscilatória de alta frequência sem NOi; GVAFNO ventilação oscilatória de alta frequência com NOi.

## **3.2 Lesão oxidativa**

### **3.2.1 Capacidade antioxidante total**

Os grupos submetidos a ventilação oscilatória de alta frequência exibiram TAP no tecido pulmonar comparável ao GC e, significativamente, maior que os grupos GVM indicando maior proteção contra o estresse oxidativo nos grupos VOAF. Embora sem significância estatística, o GVM associado ao NOi mostrou TAP maior que o GVM sem o gás.

### **3.2.2 Análise do dano ao DNA em tecido pulmonar**

O dano ao DNA endógeno foi significativamente mais elevado nos animais submetidos a VMC sem NOi que nos grupos GC, GVAF e GVMC sem óxido nítrico (tabela 1).

## **3.3 Contagem de células polimorfonucleares**

A porcentagem de células PMN recuperadas do lavado broncoalveolar foi significativamente mais elevada no GVMC que nos GVAF e no GVMNO, as quais forma similares ao GC (tabela 1).

## **3.4 Quantificação dos produtos do óxido nítrico no plasma**

Não houve diferença entre os grupos para concentração de NO $\times$  (tabela 1).

---

**Tabela 1.** Avaliação da capacidade antioxidante total (TAP), Dano ao DNA no tecido pulmonar, número de células polimorfonucleares (PMN) e concentração nitrito/nitrato no plasma.

	<b>GC</b>	<b>GVM</b>	<b>GVMNO</b>	<b>GVAF</b>	<b>GVAFNO</b>
Performance antioxidante (%proteção g/proteína)	58,9±4,31	46,9±3,09	55,9±2,4	69,2±5,02*	68,7±4,14*
Dano do DNA (%DNA na calda)	10,6±2,04*	29,9±3,91	8,75±3,06*	8,65±2,42*	7,10±2,18*
Número de células PNM × 10 <sup>6</sup> (lavado broncoalveolar)	0,21±0,17*	4,56±1,82	0,91±0,42	0,41±0,18*	0,29±0,18*
Concentração no plasma nitrito/nitrato	3,54±0,51	4,44±0,96	8,71±1,96	6,14±1,30	6,17±1,22

Dados são mostrados com média±DP. \*p<0,05 comparando grupos com o grupo de ventilação mecânica convencional (VMC). One Way análise de variância (teste de Student-Newman-Keus). Grupo GC, grupo controle; GVM ventilação mecânica convencional sem NOi; GVMNO ventilação mecânica convencional com NOi; GVAF ventilação oscilatória de alta frequência sem NOi; GVAFNO ventilação oscilatória de alta frequência com NOi.

## 4. DISCUSSÃO

Este estudo corrobora achados prévios de que a VOAF, *per se*, aumenta a oxigenação e apresenta efeito protetor contra o estresse oxidativo e a lesão inflamatória pulmonar. Além disso, os efeitos da VOAF não aumentam quando o NOi foi associado e a ventilação mecânica convencional associou-se a melhora da oxigenação e redução do dano ao DNA quando utilizada juntamente com o NOi.

Até onde pudemos constatar, este é o primeiro estudo que associou VOAF ao NOi e comparou o dano no DNA em tecido pulmonar pelo teste do cometa. Demonstramos previamente, por meio da avaliação da TAP, que a VOAF tem importante função de proteção contra a lesão pulmonar oxidativa em modelo experimental de LPA (Ronchi et al., 2011). De fato, a VOAF tem mostrado, consistentemente, benefícios em SDRA em estudos clínicos e experimentais (Imai et al., 2001; Mehta et al., 2004; Rotta et al., 2001). Em acordo com estudos prévios nosso estudo confirmou que a VOAF melhora oxigenação e reduz lesão inflamatória (Mehta et al., 2004; Rotta et al., 2001).

O óxido nítrico inalatório melhora a oxigenação arterial em pacientes com SDRA por diminuir o *shunt* intrapulmonar e a pressão arterial pulmonar (Rossaint et al., 1993). Administrado em baixas doses e sob monitoração contínua, o gás é opção terapêutica segura para tratar hipertensão pulmonar (Rossaint et al., 1994). Fioretto et al. (2004) observaram melhora aguda no índice de oxigenação quando o NOi foi administrado precocemente e associado a VMC, 1,5 horas após o diagnóstico de SDRA em crianças, quando comparado a VMC sem o gás. O tratamento prolongado também levou a aumento da oxigenação, além disso a FiO<sub>2</sub> e a pressão inspiratória de pico puderam ser diminuídas de forma rápida e significativa.

---

Outros investigadores tem sugerido que o NOi pode diminuir o processo inflamatório. Razavi et al. (2002) avaliaram o efeito do NOi sobre a inflamação pulmonar em modelo em ratos com lesão pulmonar induzida por sepse, demonstrando que a exposição precoce ao gás relacionava-se a diminuição da infiltração por leucócitos e a menos lesão oxidativa, avaliada pela medida da 8-isoprostana. Weigand et al. (2000) analisaram a peroxidação lipídica pelo malondialdeído, hexanal e pentanal em pacientes com SDRA. Eles demonstraram que malondialdeído, hexanal e pentanal estavam significativamente elevados, dado que indicava peroxidação lipídica pulmonar. Não obstante, a concentração sanguínea destes produtos da peroxidação lipídica não foram afetados pela administração de NOi por 24h.

Parece que a resposta ao NOi é melhor em pacientes com insuficiência respiratória mais grave (Dobyns et al., 1999) e quando administrado logo após o diagnóstico de SDRA (Fioretto et al., 2004). Estes resultados apontam para o início de uma dose baixa de NOi para atenuar a inflamação pulmonar. Em acordo, Chollet-Martin et al. (1996) que mostraram que a redução da inflamação pulmonar na SDRA induzida pelo gás é refletida por ativação de PMN e liberação de IL-8 / IL-6. Além disso, outro estudo do nosso grupo comparando VMC com e sem NOi, mostrou que a administração precoce de baixa dose de NOi atenuou o estresse oxidativo e as lesões histológicas e inflamatórias (Fioretto et al., 2012).

É interessante notar que o NOi não teve impacto quando associado a VOAF em nosso modelo. Porém, quando administrado junto a VMC, imediatamente após a lesão pulmonar, observamos que o dano ao DNA foi significativamente menor na VMC com NOi do que sem o gás. Apesar de não significativa a avaliação da TAP evidenciou aumento da capacidade antioxidante no tecido pulmonar do GVMNO. Entretanto, como pacientes com SDRA são submetidos a ventilação mecânica por longos períodos em unidades de terapia intensiva, mais estudos são necessários para avaliar os mecanismos de dano

---

pulmonar por lesão oxidativa em plasma de pacientes usando a TAP e diferentes estratégias de ventilação. Este conhecimento fornecerá melhor entendimento da proteção antioxidante contra o estresse oxidativo na SDRA. O fato do NOi não ter efeito quando associado a VOAF pode ser devido ao fato de que esse modo ventilatório, *per se*, já evita grandes variações de pressões e volumes alveolares, reduzindo a lesão pulmonar. Entretanto, quando associado a ventilação mecânica convencional os efeitos do NOi podem ser mais claramente identificados.

Estes achados podem ser também ser explicados pelas diferenças nos modelos animais de lesão pulmonar. Idealmente, o modelo animal de LPA deve reproduzir os mecanismos e as consequências da LPA humana, inclusive mudanças fisiológicas e patológicas. Porém, nenhum modelo animal sozinho reproduz todas as características da SDRA nos humanos. Os coelhos, por exemplo, tem 57% de similaridade com a região variável TLR4 e estão associados a moderada produção de óxido nítrico. Diferentemente, ratos e camundongos têm alta produção de óxido nítrico, a qual é discreta em humanos e primatas (Matute-Bello et al., 2008).

Atualmente, um dos modelos de indução de lesão pulmonar mais utilizados é a lavagem alveolar com salina aquecida. É, primariamente, um modelo de depleção de surfactante que causa lesão pulmonar muito semelhante a SDRA humana nos efeitos sobre oxigenação, complacência pulmonar, atelectasia e edema perivascular e peribrônquico. Porém, induz menos infiltração por macrófagos e linfócitos, a menos que outra agressão, como a ventilação mecânica, seja adicionada (Matute-Bello et al., 2008).

Com relação a dose de NOi, é recomendado que o paciente seja mantido com a dose mais baixa associada a resposta positiva na oxigenação, ou seja, acréscimo maior ou igual a 10 mmHg na relação PaO<sub>2</sub> /FiO<sub>2</sub> (Cuthbertson et al., 1997; Fioretto et al., 2003). Previamente, em estudo clínico de nosso grupo, dose mais baixa de NOi (5 ppm) foi administrada pelo período mais curto de tempo para diminuir os potenciais efeitos tóxicos como formação de metahemoglobina

---

e acúmulo de dióxido de nitrogênio. O mesmo princípio e dose foram utilizados no presente estudo. Além disso, procuramos usar a mesma dose que usamos em estudos prévios para torná-los comparáveis (Fioretto et al., 2011, 2004).

### **Implicações Futuras**

Primeiramente, em função da complexidade da fisiopatologia da SDRA, encontrar um único tratamento para a síndrome será difícil. Mais estudos sobre estes mecanismos deverão se realizados para se obter o melhor desfecho. A avaliação da TAP e o teste do cometa devem continuar em uso para avaliar a capacidade antioxidante e o estresse oxidativo dos pacientes. Como demonstramos, esses testes podem identificar o estresse oxidativo em modelos experimentais (Ronchi et al., 2012). Em segundo lugar, o uso de suplementos antioxidantes poderão ser importante recurso de tratamento destes pacientes minimizando a lesão causada pelo estresse oxidativo. Também demonstramos correlação entre os valores de biomarcadores de estresse oxidativo no sangue periférico e nos órgãos alvos, sugerindo que a avaliação dos sangue periférico poderá ser utilizada em grandes estudos epidemiológicos conduzidos por intensivistas quando a avaliação do órgão envolvido não for possível.

---

## **CONCLUSÃO**

O óxido nítrico inalatório não traz efeitos benéficos quando associado a VOAF no que diz respeito ao estresse oxidativo e dano no DNA do pulmão. De maneira geral, a lesão pulmonar pode ser atenuada utilizando a VOAF ou a VMC protetora associadas ao NOi.

---

## Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses

## **AGRADECIMENTOS**

Financiado em parte pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), São Paulo, SP, número do processo: 2008/08199-2 e por U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service under Cooperative Agreement, USDA:58-1950-7-07. Qualquer opinião, achado, conclusão ou recomendação expressa nesta publicação são do autor e não refletem, necessariamente, a opinião da UNESP ou do Departamento de Agricultura dos EUA. Nós agradecemos a todos os funcionários do laboratório clínico e experimental do Departamento de Pediatria – UNESP e do laboratório Experimental da Tufts University por sua assistência e a Colin E. Knaggs pela revisão do texto.

---

Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000. 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.* 342, 1301–1308.

ARDS, 2012. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition. *J. Am. Med. Assoc.* 307, 2526–2533.

Allardet-Servent, J., Bregeon, F., Delpierre, S., Steinberg, J.G., Payan, M.J., Ravailhe, S., Papazian, L., 2008. High-frequency percussive ventilation attenuates lung injury in a rabbit model of gastric juice aspiration. *Intensive Care Med.* 34, 91–100.

Beretta, G., Aldini, G., Facino, R.M., Russell, R.M., Krinsky, N.I., Yeum, K.J., 2006. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal. Biochem.* 354, 290–298.

Bloomfield, G.L., Holloway, S., Ridings, P.C., Fisher, B.J., Blocher, C.R., Sholley, M., Bunch, T., Sugerman, H.J., Fowler, A.A., 1997. Pretreatment with inhaled nitric oxide inhibits neutrophil migration and oxidative activity resulting in attenuated sepsis-induced acute lung injury. *Crit. Care Med.* 25, 584–593.

Chollet-Martin, S., Gatecel, C., Kermarrec, N., Gougerot-Pocidallo, M.A., Payen, D.M., 1996. Alveolar neutrophil functions and cytokine levels in patients with the adult respiratory distress syndrome during nitric oxide inhalation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 985–990.

Crow, J.P., Beckman, J.S., 1995. The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 196, 57–73.

---

Cuthbertson, B.H., Dellinger, P., Dyar, O.J., Evans, T.E., Higenbottam, T., Latimer, R., Payen, D., Stott, S.A., Webster, N.R., Young, J.D., 1997. UK guidelines for the use of inhaled nitric oxide therapy in adult ICUs. American-European Consensus Conference on ALI/ARDS. *Intensive Care Med.* 23, 1212–1218.

Dahlem, P., Van Aalderen, W.M., Bos, A.P., 2007. Pediatric acute lung injury. *Paediatr. Respir. Rev.* 8, 348–362.

Dobyns, E.L., Cornfield, D.N., Anas, N.G., Fortenberry, J.D., Tasker, R.C., Lynch, A., Liu, P., Eells, P.L., Griebel, J., Baier, M., Kinsella, J.P., Abman, S.H., 1999. Multicenter randomized controlled trial of the effects of inhaled nitric oxide therapy on gas exchange in children with acute hypoxemic respiratory failure. *J. Pediatr.* 134, 406–412.

Fioretto, J.R., 2003. Inhaled nitric oxide in pediatrics. *J. Pediatr.* 79, 177–186.

Fioretto, J.R., Batista, K.A., Carpi, M.F., Bonatto, R.C., Moraes, M.A., Ricchetti, S.M., Batistella, R.F., 2011. High-frequency oscillatory ventilation associated with inhaled nitric oxide compared to pressure-controlled assist/control ventilation and inhaled nitric oxide in children: randomized, non-blinded, crossover study. *Pediatr. Pulmonol.* 46, 809–816.

Fioretto, J.R., Campos, F.J., Ronchi, C.F., Ferreira, A.L., Kurokawa, C.S., Carpi, M.F., Moraes, M.A., Bonatto, R.C., Defaveri, J., Yeum, K.J., 2012. 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* 57, 273–281.

---

Fioretto, J.R., Moraes, M.A., Bonatto, R.C., Ricchetti, S.M., Carpi, M.F., 2004. Acute and sustained effects of early administration of inhaled nitric oxide to children with acute respiratory distress syndrome. *Pediatr. Crit. Care Med.* 5, 469–474.

Gaies, M.G., Gurney, J.G., Yen, A.H., Napoli, M.L., Gajarski, R.J., Ohye, R.G., Charpie, J.R., Hirsch, J.C., 2010. Vasoactive-inotropic score as a predictor of morbidity and mortality in infants after cardiopulmonary bypass. *Pediatr. Crit. Care Med* 11, 234–238.

Girard, T.D., Bernard, G.R., 2007. Mechanical ventilation in ARDS: a state-of-the-art review. *Chest* 131, 921–929.

Guzik, T.J., Korbut, R., Adamek-Guzik, T., 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 54, 469–487.

Heussel, C.P., Scholz, A., Schmittner, M., Laukemper-Ostendorf, S., Schreiber, W.G., Ley, S., Quintel, M., Weiler, N., Thelen, M., Kauczor, H.U., 2003. Measurements of alveolar pO<sub>2</sub> using <sup>19</sup>F-MRI in partial liquid ventilation. *Invest. Radiol.* 38, 635–641.

Ichinose, F., Roberts Jr., J.D., Zapol, W.M., 2004. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential. *Circulation* 109, 3106–3111.

Imai, Y., Nakagawa, S., Ito, Y., Kawano, T., Slutsky, A.S., Miyasaka, K., 2001. Comparison of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation. *J. Appl. Physiol.* 91, 1836–1844.

---

Kohelet, D., 2003. Nitric oxide inhalation and high frequency oscillatory ventilation for hypoxemic respiratory failure in infants. *Isr. Med. Assoc. J.* 5, 19–23.

Laroux, F.S., Pavlick, K.P., Hines, I.N., Kawachi, S., Harada, H., Bharwani, S., Hoffman, J.M., Grisham, M.B., 2001. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol. Scand.* 173, 113–118.

Matute-Bello, G., Frevert, C.W., Martin, T.R., 2008. Animal models of acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295, 379–399.

Mcculloch, P.R., Forkert, P.G., Froese, A.B., 1988. Lung volume maintenance prevents lung injury during high frequency oscillatory ventilation in surfactant-deficient rabbits. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137, 1185–1192.

Mehta, S., Granton, J., Macdonald, R.J., Bowman, D., Matte-Martyn, A., Bachman, T., Smith, T., Stewart, T.E., 2004. High-frequency oscillatory ventilation in adults: the Toronto experience. *Chest* 126, 518–527.

Miles, A.M., Wink, D.A., Cook, J.C., Grisham, M.B., 1996. Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymol.* 268, 105–120.

Phua, G.C., Govert, J., 2008. Mechanical ventilation in an airborne epidemic. *Clin. Chest Med.* 29, 323–328.

Razavi, H.M., Werhun, R., Scott, J.A., Weicker, S., Wang Le, F., McCormack, D.G., Mehta, S., 2002. Effects of inhaled nitric oxide in a mouse model of sepsis-induced acute lung injury. *Crit. Care Med.* 30, 868–873.

---

Ronchi, C.F., Ferreira, A.L., Campos, F.J., Kurokawa, C.S., Carpi, M.F., Moraes, M.A., Bonatto, R.C., Defaveri, J., Yeum, K.J., Fioretto, J.R., 2011. High-frequency oscillatory ventilation attenuates oxidative lung injury in a rabbit model of acute lung injury. *Exp. Biol. Med.* 236, 1188–1196.

Ronchi, C.F., Fioretto, J.R., Ferreira, A.L., Berchieri-Ronchi, C.B., Correa, C.R., Kurokawa, C.S., Carpi, M.F., Moraes, M.A., Yeum, K.J., 2012. Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury induced in rabbits submitted to different strategies of mechanical ventilation. *J. Appl. Physiol.* 112, 1184–1190.

Rossaint, R., 1994. Nitric oxide: a new area in intensive care. *Presse Med.* 23, 855–858. Rossaint, R., Falke, K.J., Lopez, F., Slama, K., Pison, U., Zapol, W.M., 1993. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 328, 399–405. Rotta, A.T., Gunnarsson, B., Fuhrman, B.P., Hernan, L.J., Steinhorn, D.M., 2001. Comparison of lung protective ventilation strategies in a rabbit model of acute lung

injury. *Crit. Care Med.* 29, 2176–2184.

Sittipunt, C., Steinberg, K.P., Ruzinski, J.T., Myles, C., Zhu, S., Goodman, R.B., Hudson, L.D., Matalon, S., Martin, T.R., 2001. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 503–510.

Ware, L.B., Matthay, M.A., 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 342, 1334–1349.

Weigand, M.A., Snyder-Ramos, S.A., Mollers, A.G., Bauer, J., Hansen, D., Kochen, W., Martin, E., Motsch, J., 2000. Inhaled nitric oxide does not enhance lipid peroxidation in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 28, 3429–3435.

---

## *IV – Desdobramentos da Tese*

Em decorrência de nossa atuação no Centro de Pesquisa Clínica e Experimental do Departamento de Pediatria – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, desde a implantação do modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 2006, foi possível a realização do mestrado, da atual tese de doutoramento e a participação em outros projetos do grupo. Cabe destacar o trabalho publicado na revista *Experimental Biology and Medicine* 2011; 236: 1188–1196. DOI: 10.1258/ebm.2011.011085 por Ronchi CR, Ferreira ALA, Campos FJ et al. Esse estudo comparou a ventilação mecânica convencional protetora (VMC) e a ventilação oscilatória de alta frequência (VOAF) quanto a oxigenação, estresse oxidativo pulmonar, inflamação e lesão pulmonar histopatológica em modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) em coelhos, utilizando, pela primeira vez na literatura, método de avaliação global da oxidação do tecido pulmonar (*Total Antioxidant Performanece*). Demonstramos que o tratamento com VAF melhora a oxigenação, o processo inflamatório, reduz o dano histopatológico e atenua o estresse oxidativo pulmonar comparado à ventilação mecânica convencional.

Mais recentemente, em 2015, novo projeto aprovado pela FAPESP sob o número 2014/15683-9 (Efeito da suplementação com licopeno sobre o estresse oxidativo pulmonar induzido por lesão pulmonar aguda experimental) estudará o papel do licopeno no estresse oxidativo pulmonar de animais submetidos a diferentes estratégias ventilatórias protetoras, garantindo a continuação dos estudos na área e nossa ligação com o grupo de pesquisa.

---

*V – Considerações finais*

A SDRA é doença respiratória grave e que motiva a internação ou complica 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 SDRA apresenta fisiopatologia complexa, com lesão pulmonar extensa e conseqüente diminuição da relação V/Q e da oxigenação. Desta forma, além da estabilização hemodinâmica e hidreletrolítica dos pacientes, 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.

Existem poucos estudos avaliando o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento e progressão da SDRA e correlacionando-o com outras modalidades terapêuticas empregadas na condução dos pacientes com a síndrome. Assim como são conflitantes os resultados de estudos que avaliaram a suplementação com antioxidantes na SDRA.

Sabemos que a melhor fonte de antioxidantes, que têm um papel fundamental no combate ao estresse oxidativo, é a alimentação. Existe grande variedade de alimentos ricos em antioxidantes, o que justifica estudos clínicos mais aprofundados para avaliar se ocorrem mudanças no metabolismo oxidativo em pacientes gravemente enfermos submetidos à suplementação dietéticas destes elementos.

---