



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

Susiane de Oliveira Klefens Barbosa

**Efeito da suplementação com licopeno sobre o estresse
oxidativo pulmonar induzido por lesão pulmonar aguda
experimental**

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

Orientador: Professor Titular Dr. José Roberto Fioretto

Susiane de Oliveira Klefens Barbosa

Efeito da suplementação com licopeno sobre o
estresse oxidativo pulmonar induzido por lesão
pulmonar aguda experimental

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

Orientador: Professor Titular Dr. José Roberto Fioretto
Coorientador: Professor Dr. Carlos Fernando Ronchi

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Barbosa, Susiane de Oliveira Klefens.

Efeito da suplementação com licopeno sobre o estresse oxidativo pulmonar induzido por lesão pulmonar aguda experimental / Susiane de Oliveira Klefens Barbosa. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: José Roberto Fioretto

Coorientador: Carlos Fernando Ronchi

Capes: 40101126

1. Lesão Pulmonar. 2. Síndrome do desconforto respiratório em adultos. 3. Respiração artificial. 4. Stress oxidativo. 5. Carotenóides.

Palavras-chave: Carotenóides; Estresse Oxidativo; Lesão Pulmonar; SDRA; Ventilação Mecânica.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Osvaldo e Susete, pelo apoio e pelo eterno incentivo. Espelho-me em vocês que são meus maiores exemplos de trabalho, de responsabilidade e dedicação. Por nunca medirem esforços para proporcionar as melhores oportunidades na minha formação pessoal e profissional. À vocês, todo meu amor e gratidão.

Ao meu marido Thiago, companheiro e grande amor. Obrigada por estar ao meu lado incondicionalmente em todos os momentos, me motivando, sendo calma nas horas difíceis e me apoiando sempre. Te amo demais.

Aos meus irmãos que tanto os amo e admiro, Ricardo e Paula, que apesar da distância, sempre estiveram presentes, me incentivando e me apoiando em cada passo.

Agradecimentos

“O Senhor é meu pastor e nada me faltará”. (Salmo 23)

E nada me faltou!

Não faltou o medo, não faltaram obstáculos e dificuldades nesta jornada, não me faltou vontade de desistir quando tudo parecia não ter solução, mas também não me faltou a fé e a coragem, não me faltou ânimo, disposição e determinação, e principalmente não faltaram pessoas dispostas a me ajudar... Minha eterna gratidão à todos que fizeram parte deste trabalho.

Agradeço à Deus, que me guia e ilumina meu caminho, que me mantém firme e com saúde sob suas bênçãos, amparando-me em todos os momentos e permitindo que eu realize meus sonhos e objetivos.

Ao meu orientador e amigo Jose Roberto Fioretto, que deu a oportunidade de realizar esse trabalho. Meu sincero agradecimento por compartilhar sua sabedoria, por todos os conselhos, pela disposição e paciência em ensinar. Obrigada por confiar no meu trabalho durante todos esses anos. Minha eterna gratidão.

Ao coorientador Fernando Ronchi, que se fez presente mesmo à quilômetros de distância. Por toda paciência e dedicação, e que prontamente me auxiliava nas dúvidas que surgiam. Por possibilitar que eu desenvolvesse esse trabalho que têm seu próprio mérito na elaboração. Muito obrigada.

Ao Mario Carpi, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados, suas orientações foram precisas. Obrigada pela dedicação e total apoio em cada fase desse trabalho.

À Ana Lucia dos Anjos, que eu chamaria de mãe desse trabalho. Obrigada por idealizar um projeto que parecia distante das nossas possibilidades. Obrigada pela oportunidade de me fazer compreender um pouco sobre os antioxidantes e unir esses conhecimentos à nossa experiência com lesão pulmonar. Obrigada pelos ensinamentos de bancada. Você é parte fundamental desse trabalho.

Aos funcionários Bardela e Renato, que muito me auxiliaram em cada cirurgia realizada.

À Camila Camacho, Regina Moretto, Cristina Fortes e Vickeline Namba, um agradecimento especial, por me ensinarem com muita paciência e carinho, cada técnica de laboratório e também sobre a vivência da pesquisa de bancada.

Aos irmãos José Carlos Georgete, responsável pela coordenação e infraestrutura, logística e suporte acadêmico e Paulo César Georgete responsável pelo biotério: a ajuda, a paciência e o apoio de vocês foram fundamentais na rotina da experimentação.

Ao médico patologista Alexandre Fabro, que nos auxiliou com a histologia pulmonar, bem como agradeço o professor Carlos Roberto Padovani que nos orientou com as análises estatísticas.

Muito obrigada à todos os funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental - UNIPEX que se envolveram de alguma forma na realização desse trabalho; meu sincero agradecimento à cada um de vocês.

À seção técnica de pós-graduação da FMB/ UNESP e especialmente à Ana Mengue, secretária da Pós-Graduação do Departamento de Fisiopatologia em Clínica Médica, por toda ajuda, esclarecimentos e apoio.

Aos funcionários do departamento de Pediatria, especialmente ao Fabiano Michelin, por toda ajuda e atenção.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro e apoio concedido (processo nº 2014/15683-9) e à CAPES pela bolsa concedida neste período.

ÍNDICE

Páginas

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	05
Biomarcadores do estresse oxidativo.....	09
Suplementação com antioxidantes na SDRA.....	10
2. Objetivos.....	12
Objetivo geral.....	12
3. Materiais e Métodos.....	12
Obtenção, preparo e distribuição dos animais.....	12
Suplementação com licopeno.....	12
Distribuição e instrumentação dos animais.....	13
Instalação do modelo de lesão pulmonar.....	15
Formação dos grupos experimentais.....	15
Desenho do protocolo.....	17
Manipulação dos pulmões.....	17
Histologia pulmonar.....	18
Contagem de células polimorfonucleares no fluido de lavagem broncoalveolar.....	18
Procedimento com sangue coletado.....	18
Análise dos carotenoides presentes na dieta.....	19
Análise do licopeno no plasma.....	19
Determinação da lesão oxidativa do DNA no plasma.....	20
Determinação da lesão oxidativa pulmonar.....	21
Preparação dos lipossomas.....	21
Efeito da lesão pulmonar sobre a capacidade antioxidante total (TAP).....	21
Variáveis analisadas.....	22
Análise estatística.....	22
4. Resultados.....	23
5. Discussão.....	32
Limitações do estudo.....	34
6. Conclusões.....	35
7. Referências Bibliográficas.....	36
Anexos.....	42

Resumo

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) caracteriza-se por processo inflamatório que leva à quebra da barreira alvéolo-capilar com desenvolvimento de edema intersticial e alveolar, diminuição da complacência pulmonar, hipertensão pulmonar, desequilíbrio da relação ventilação/perfusão e hipoxemia refratária à administração de oxigênio. Apesar do progresso no entendimento de sua fisiopatologia e consequente avanço em estratégias terapêuticas de pacientes com SDRA, a mortalidade permanece elevada.

Entre os mecanismos que levam a síndrome, várias evidências sugerem que pacientes portadores de SDRA estão expostos a elevado grau de estresse oxidativo (EO) induzido por ampla variedade de eventos. Por essa razão é fundamental a compreensão do papel do EO tanto na instalação como na perpetuação do processo inflamatório que ocorre na doença. No entanto, apesar do uso de antioxidantes ter mostrado algum benefício na evolução da doença, ainda não há evidência clínica para sua utilização rotineira na prática. O licopeno é um carotenoide sem atividade provitamina A encontrado principalmente no tomate e nas frutas vermelhas. Em decorrência de seu grande número de duplas ligações conjugadas, o licopeno é considerado um dos melhores antioxidantes entre os carotenoides. Além disso, é um dos mais potentes antioxidantes encontrados no organismo humano, apresentando potência antioxidante 100 vezes maior do que a vitamina E e a vitamina C.

A ventilação mecânica convencional protetora (VMC) constitui um dos principais pilares do tratamento da SDRA, sendo capaz de modificar a evolução da doença e reduzir a mortalidade.

Baseado nos efeitos protetores da ventilação oscilatória de alta frequência (VOAF) sobre a SDRA, anteriormente descritos pelo grupo, bem como o potencial papel antioxidante e antiinflamatório do licopeno, nossa hipótese é que esse carotenoide exerce efeito protetor adicional em modelo experimental de SDRA.

O objetivo do estudo foi investigar os efeitos da suplementação com licopeno sobre o EO pulmonar, por meio da capacidade antioxidante total (TAP) e dano oxidativo do DNA (teste do Cometa), em modelo experimental de lesão pulmonar induzida em coelhos ventilados com VMC e VOAF, comparando-os com grupo controle. Também foram avaliadas a histologia pulmonar e a inflamação pela contagem de células de neutrófilos no lavado broncoalveolar. Cinquenta e cinco coelhos foram instrumentados com traqueostomia, acessos vasculares e ventilados mecanicamente. Os animais suplementados receberam 10mg/Kg de licopeno durante 21 dias antes do experimento. A lesão pulmonar foi induzida por infusão traqueal de salina aquecida (30mL/Kg, 38°C). Foram formados os seguintes grupos experimentais: animais sadios foram submetidos a eutanásia para compor o grupo *baseline* sem suplementação: GBL; n=5 e *baseline* suplementado com licopeno: GBLL; n=5, animais sadios submetidos à VM Protetora, sem suplementação denominado grupo controle GC; n=5, animais submetidos à indução da lesão pulmonar e tratamento com ventilação mecânica e suplementados com licopeno GVMCL; n=10 e sem suplementação GVMC; n=10, com LP submetidos à VOAF e suplementados com licopeno GVAFL; n=10 e sem suplementação GVAF; n=10. Após a confirmação da lesão pulmonar, as gasometrias foram realizadas a cada 30 minutos pelas 4 horas de duração do protocolo experimental. O nível de significância foi de 5%. Comparando os momentos, antes e depois da lesão pulmonar em cada grupo, houve piora significativa da oxigenação e também diminuição da complacência pulmonar estática em todos os grupos. Após 4 horas, os grupos tratados com VOAF, com e sem licopeno, e o grupo sob VMC protetora com licopeno, apresentaram melhora significativa em relação ao grupo VMC protetora sem suplementação, apresentando relação de PaO_2/FiO_2

semelhante aos momentos antes da indução da lesão pulmonar e em relação ao GC. A contagem de neutrófilos no lavado broncoalveolar mostrou que os grupos GVMCL e GVAFL, apresentaram valores significativamente menores em comparação com os animais sem suplementação. GC, GVAFL e GVMCL apresentaram escore de lesão histológica significativamente menor quando comparados com os grupos sem suplementação. Quanto ao TAP no tecido pulmonar, não houve diferença estatística entre os grupos. O dano do DNA nos linfócitos, comparando os animais sob VMC protetora, foi significativamente mais baixo nos animais suplementados com licopeno. Este estudo demonstra que independentemente do modo ventilatório, a suplementação prévia com licopeno melhora a oxigenação, reduz a lesão inflamatória bem como a lesão histopatológica nos animais, assemelhando-se aos benefícios propostos pela VOA, e minimiza o dano no DNA nos animais sob VMC protetora com suplementação em relação aos animais sob mesma ventilação.

Palavras-chave: Síndrome do desconforto respiratório agudo, Lesão pulmonar, Ventilação mecânica, Carotenoides, Estresse oxidativo, Lesão de DNA, Capacidade antioxidante total, Inflamação.

Abstract

Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is characterized by inflammatory process that leads to the breakdown of the alveolar-capillary barrier with the development of interstitial and alveolar edema, decreased pulmonary compliance, pulmonary hypertension, impaired ventilation and perfusion, and hypoxemia refractory to administration of oxygen. Despite better understanding in pathophysiology and consequent advancement in therapeutic strategies for ARDS patients, mortality remains high.

Although the exact mechanism leading to ARDS is unknown, several evidences suggest that patients with the syndrome are exposed to a high degree of oxidative stress. For this reason it is important to understand the role of oxidative stress in both, initiation and progress of inflammatory process that occurs in the disease. However, although the use of antioxidants has shown some benefit in ARDS evolution, there is still no clinical evidence for its use in practice routine.

Lycopene is a carotenoid with no provitamin A activity found mainly in tomatoes and red fruits. Due to its large number of double conjugated bonds, lycopene is considered one of the best antioxidants among carotenoids. In addition, it is one of the most potent antioxidants found in the human body, with antioxidant potency 100 times higher than vitamin E and vitamin C.

Conventional mechanical ventilation (CMV) is the main ARDS treatment, capable of modifying disease evolution and reducing mortality.

Based on the protective effects of high frequency oscillatory ventilation (HFOV) on ARDS, previously described by our group, as well as the potential antioxidant and antiinflammatory role of lycopene, our hypothesis is that this carotenoid has additional protective effect in ARDS model.

The aim of this study was to investigate the effects of lycopene supplementation on pulmonary oxidative damage, analyzing total antioxidant performance (TAP) and oxidative DNA damage (Comet Assay), in an experimental induced lung injury model in rabbits, ventilated by CMV and HFOV compared to control group. Pulmonary histology and neutrophil cell counts were also evaluated. Fifty-five rabbits were instrumented with tracheostomy, vascular accesses and mechanically ventilated. Supplemented animals received 10mg/ kg of lycopene for 21 days prior to the experiment. Lung injury was induced by tracheal infusion of warm saline (30mL/ kg, 38°C). The following experimental groups were: healthy animals submitted to euthanasia to compose the baseline group without supplementation: GBL; n = 5 and baseline supplemented with lycopene: GBLL; n = 5, healthy animals submitted to Protective CMV, without supplementation, denominated GC control group; n = 5, animals submitted to lung injury induction and mechanical ventilation treatment and supplemented with lycopene GVMCL; n = 10 and without supplementation GVMC; n = 10, animals with LP submitted to HFOV and supplemented with lycopene GVAFL; n = 10 and without supplementation GVAF; n = 10. After confirming lung injury induction, blood gases were performed every 30 minutes during the 4 hours of the experimental protocol. The level of significance was 5%. Comparing the moments before and after the pulmonary injury induction in each group, there was a significant worsening of oxygenation and decrease in static lung compliance in all groups after injury induction. After 4 hours, groups treated with HFOV, with and without lycopene supplementation, and group with lycopene supplementation and submitted protective CMV, showed a significant improvement compared to Protective CMV group without supplementation, showing PaO₂/FiO₂ ratio similar to the moments before the pulmonary induction and CG. Neutrophil count in bronchoalveolar lavage showed that GVMCL and GVAFL groups presented significantly lower

comparing with animals without supplementation. GC, GVAFL and GVMCL had a significantly lower histological injury score compared to groups without supplementation. TAP in lung tissue showed no statistical difference among groups. DNA damage on lymphocytes comparing animals submitted to protective CMV was significantly lower in animals supplemented with lycopene. This study demonstrates that independent of the ventilatory mode, prior lycopene supplementation improves oxygenation, reduced inflammatory injury, as well as histopathological injury score in this lung injury animal model. Both HFOV groups, and animals submitted to protective CMV and supplemented with lycopene showed reduced DNA-free damage compared to animals under the same ventilation without supplementation.

Key words: Acute respiratory distress syndrome, Lung injury, Mechanical ventilation, Carotenoids, Oxidative stress, DNA damage, Total antioxidant performance, Inflammation.

1. Introdução

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) determina insuficiência respiratória que, em alguns casos, cursa com mortalidade elevada (Ashbaugh *et al.*, 1967; Dernaika *et al.*, 2009). Pode ser causada por agressão pulmonar direta (primária), como ocorre na síndrome aspirativa, infecção pulmonar, quase afogamento e contusão pulmonar, ou pode ser originada por agressão indireta (secundária), como na sepse, politraumatismo, em transfusões maciças de hemoderivados, entre outras (Gattinoni *et al.*, 1988). 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 (V/Q) e hipoxemia refratária à administração de oxigênio (Sessler, 1998). A lesão dos pneumócitos do tipo II, produtores de surfactante, e a inativação do surfactante pelo processo inflamatório também contribuem para o colapso expiratório de unidades alveolares, com redução da capacidade residual funcional. Além disso, a SDRA cursa com hipertensão pulmonar resultante do aumento da resistência vascular pulmonar produzido por combinação complexa de lesão pulmonar primária, decorrente da resposta inflamatória à agressão pulmonar, e de complicações do tratamento, principalmente a lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (Sibbald *et al.*, 1983).

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 (The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000) e de 43% a 62% em crianças (Fioretto *et al.*, 2001; Okamoto *et al.*, 1998).

Embora a patogênese da SDRA seja multifatorial, a presença do estresse oxidativo (EO) é denominador comum e determinante. De fato, existem evidências de que as espécies reativas de oxigênio (ROS) determinem lesão endotelial vascular e epitelial pulmonar (Ciencewicz *et al.*, 2008), sendo responsáveis pelo desenvolvimento e progressão da síndrome (Siler *et al.*, 1989). Dessa forma, torna-se fundamental a melhor compreensão do papel do EO tanto na instalação como na perpetuação do processo inflamatório que ocorre na síndrome (Chow *et al.*, 2003).

A patogênese da SDRA envolve a instalação de um fator agressor com subsequente inflamação alveolar e endotelial. As principais células ativadas nesse processo inflamatório são macrófagos, células epiteliais e neutrófilos. A ativação do macrófago determina a lesão de fase aguda (aumento de IL-1 β , IL-8, IL-6, fator de

necrose tumoral-alfa e proteína inibidora de macrófago) e de fase tardia (estimulação de fibroblasto e de crescimento celular). A ativação de células epiteliais reduz as proteínas produtoras de surfactante e diminui a reabsorção do edema alveolar. A ativação de neutrófilos aumenta adicionalmente a liberação de citocinas inflamatórias, com incremento da apoptose neutrofílica e geração de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS). A geração aumentada dessas espécies perpetua o processo, pois há diminuição ainda mais acentuada da produção de surfactante. Além disso, as espécies reativas são capazes de estimular o fator capá (NF- κ B), presente no núcleo da célula, responsável pela expressão de genes inflamatórios (como IL-6 e ICAM 1) (Lee e Downey, 2001; Soltan-Sharifi *et al.*, 2007).

A produção exagerada das espécies reativas e de outros componentes desequilibra a integridade da membrana alvéolo-capilar, levando à formação da membrana hialina, marca histológica da fase aguda da síndrome, via reação de oxidação (lipídica e proteica). Os produtos da degradação de fibrina podem aumentar a permeabilidade vascular e causar vasoconstrição, outro fator que favorece a formação de edema (Carvalho *et al.*, 1999; Kinkel *et al.*, 1999).

As ROS são continuamente geradas pelo metabolismo fisiológico (Abraham *et al.*, 2000) e o aumento na sua geração ou a diminuição da capacidade antioxidante do organismo pode estar envolvido na patogênese da SDRA (Lamb *et al.*, 1999). Estes efeitos podem comprometer a viabilidade das células ou induzir uma variedade de respostas celulares por meio da geração de espécies reativas secundárias, levando à morte celular por necrose ou apoptose (Quinlan *et al.*, 1994; Ware, 2006).

O EO pode ser entendido como sendo o evento resultante do desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a geração de ROS ou RNS. As ROS são geradas tanto por sistemas enzimáticos como não enzimáticos e têm sido implicadas em grande número de processos fisiológicos (Gutteridge e Mitchell, 1999), não fisiológicos e na iniciação e progressão de doenças (Aldini *et al.*, 2007). As principais ROS são: hidroxil (OH); superóxido (O_2^-); peroxinitrito (ONOO); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); *singlet* oxigênio (1O_2); óxido nítrico (NO); ácido hipocloroso; radical hidroperóxil; radical alcóxil (LO) e hidroperóxido [L(R)OOH]. As fontes geradoras de espécies reativas são as que se seguem: redução incompleta do O_2 (mitocôndria); macrófagos e neutrófilos; endotélio; epitélio; sistemas enzimáticos (Mieloperoxidase, Xantina oxidase, NADPH-oxidase, NADPH-citocromo P450 redutase, ciclo-oxigenase, NO-sintetase); reações com metal (Ferro e Cobre) por meio das Reações de Fenton (Fe^{+++}) e de Haber-Weiss (Fe^{++}) e

reação não enzimática entre os radicais superóxido e óxido nítrico resultando na geração de peroxinitrito. Embora as ROS sejam essenciais para uma variedade de mecanismos de defesa celular (Touyz e Schiffrin, 2004), elas e as RNS podem causar lesão oxidativa em biomoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA) quando presentes em concentração superior à sua neutralização, mediada pelo sistema de defesa antioxidante.

O sistema de defesa antioxidante é constituído por vários componentes localizados nos compartimentos aquoso e lipídico. Os antioxidantes do compartimento aquoso são: glutathione (GSH); glutathione-peroxidase (GSH-Px); glutathione-redutase (GSH-Rd); superóxido dismutase (SOD); catalase, vitamina C; ácido úrico; albumina; hemoglobina; transferrina; bilirrubina e flavonoides. Os antioxidantes do compartimento lipídico são: vitamina E (principalmente -tocoferol) e carotenoides (-caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, astaxantina, cataxantina) (Ferreira e Matsubara, 1997).

Como mencionado, o EO ocorre quando a produção de espécies reativas supera a capacidade antioxidante, resultando em oxidação de lipídios (lipoperoxidação), proteínas (carbonilação e/ou nitração), carboidratos (carbonilação) e DNA (oxidação de bases). A lesão desses importantes componentes celulares leva à alteração da estrutura química e da função da célula e à morte celular. Em especial, a lesão oxidativa de DNA pode ocorrer nas bases (púricas e pirimídicas) na presença de OH, que retira um átomo de hidrogênio das ligações C-H (carboidrato-hidrogênio) gerando bases falsas (chamadas *adducts* de bases de DNA), as quais podem ser produzidas na presença ou na ausência de oxigênio. As bases falsas geradas podem atuar como oxidantes ou como redutoras (dependendo do local onde foi retirado o átomo de Hidrogênio) e comprometem a replicação e a transcrição e, conseqüentemente, prejudicam a transmissão de informação genética (Cooke *et al.*, 2003).

O papel do EO na SDRA tem sido evidenciado tanto por estudos experimentais (Rotta *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2002; Viana *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2006; Jian *et al.*, 2010; Ronchi *et al.*, 2011; Ronchi *et al.*, 2012) como por estudos clínicos (Metnitz *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2004; Soltan-Sharifi *et al.*, 2007), os quais serão detalhadamente discutidos no item “suplementação com antioxidantes na SDRA”.

No tratamento de pacientes com SDRA, a ventilação pulmonar mecânica (VM) ocupa posição de destaque (Dahlem *et al.*, 2007), pois é capaz de modificar a evolução da doença e reduzir a mortalidade (Amato *et al.*, 1998; The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000). A VM é fundamental na medida em que melhora a oxigenação por recrutamento alveolar, com restabelecimento da relação V/Q (Fioretto *et*

al., 2001). No entanto, embora 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 (pressão de pico e pressão de platô) elevadas. 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 nessas áreas, agravando a hipoxemia e piorando a evolução dos pacientes (Slutsky, 1999). Além disso, ciclos sucessivos de abertura e fechamento dos alvéolos podem determinar atelectrauma que corresponde ao colapso ou “afrouxamento” destas unidades de troca gasosa. A VM mais agressiva pode, também, propiciar a migração de mediadores inflamatórios liberados nos alvéolos para a circulação pulmonar e daí para a circulação sistêmica, podendo ocasionar disfunções orgânicas extrapulmonares (biotrauma) (Ranieri *et al.*, 2000).

Entre os métodos ventilatórios de proteção pulmonar utilizados na SDRA destacam-se a ventilação mecânica convencional protetora (VMC) (The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000) e a ventilação oscilatória de alta frequência (VOAF) (Girard e Bernard, 2007; Turner e Arnold, 2007; Allardet-Servent *et al.*, 2008). Embora a VMC seja efetiva para a maioria dos pacientes, há um número significativo deles nos quais esse modo pode não garantir a oxigenação adequada. Nestes casos, a VOAF pode ser alternativa atraente por suas características únicas (Arnold *et al.*, 1994).

A VOAF é um modo ventilatório que utiliza volume corrente menor do que o volume do espaço morto anatômico (1–3 mL/Kg) e frequência muito acima da fisiológica (3–15 Hertz, ou seja, 180–900 ciclos/minuto). Esta forma de ventilação vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de pacientes com insuficiência respiratória grave, quando a VMC falha. Além disso, há relatos de que quando a VOAF é utilizada precocemente, ocorre redução na lesão pulmonar aguda e crônica em pacientes com SDRA (Chan e Stewart, 2005). A combinação de pequena variação de volume e pressão e manutenção de pressão média de vias aéreas (MAP) tornam o uso da VOAF atrativo na SDRA. Além disso, a manutenção do volume pulmonar, que evita superdistensão pulmonar e aparecimento de atelectasia em pacientes com SDRA, e seu padrão de fluxo, podem melhorar a relação V/Q (Lia Graciano e Freid, 2002).

Em publicações recentes do nosso grupo, a VOAF mostrou benefícios substanciais em modelo experimental de lesão pulmonar. O uso da VOAF melhorou a oxigenação, reduziu o processo inflamatório e o dano histopatológico, e atenuou a lesão pulmonar oxidativa quando comparado à VMC (Ronchi *et al.*, 2011; Ronchi *et al.*, 2012; Ronchi *et al.*, 2014).

Biomarcadores do estresse oxidativo

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

Existe grande dificuldade na interpretação dos resultados originados de medidas individuais de componentes do sistema de defesa antioxidante e também das aferições da oxidação das biomoléculas. Esta limitação estimulou alguns pesquisadores a desenvolverem outros métodos nos quais é aferido o sistema de defesa antioxidante como um todo, como o TRAP (antioxidantes sequestrantes de radical) (Wayner *et al.*, 1985) e o ORAC (capacidade de absorbância dos radicais de oxigênio) (Cao e Prior, 1999). Estes métodos utilizam geradores de radicais hidrofílicos, os quais produzem radicais apenas no compartimento aquoso do plasma. Contudo, qualquer amostra biológica é constituída pelos compartimentos aquoso e lipídico. Assim, devido ao fato dos antioxidantes serem hidrossolúveis ou lipossolúveis ambos os compartimentos devem ser obrigatoriamente monitorados quando se deseja avaliar a capacidade antioxidante total de amostras biológicas. Ainda, é importante ser enfatizado que a ação protetora de um antioxidante resulta da ação sinérgica com outro antioxidante, seja ele do mesmo ou de outro compartimento. O método proposto por Aldini e colaboradores, o TAP (*total antioxidant performance*) contempla não apenas a aferição de antioxidantes dos dois compartimentos, mas também mostra o resultado da interação sinérgica entre os antioxidantes (Aldini *et al.*, 2001). Essas considerações justificam a opção por esse método para aferir a capacidade antioxidante total no presente estudo.

O teste do cometa é comumente utilizado em toxicologia genética e tornou-se um dos métodos padrões de avaliação do dano oxidativo de DNA, com aplicações em testes

de genotoxicidade, biomonitorização humana, epidemiologia molecular, e ecotoxicologia (Collins, 2004; Forchhammer *et al.*, 2010; Moller *et al.*, 2010). Apresenta inúmeras vantagens que incluem: sensibilidade; possibilidade de avaliação de danos em células individuais; necessidade de amostras celulares extremamente pequenas; possibilidade de ser aplicado em qualquer população de células, necessitando apenas de células viáveis e não necessariamente de células em proliferação. Trata-se de um teste que pode ser utilizado para avaliação da genotoxicidade tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo um método para avaliação do sistema de reparo do DNA (Tice *et al.*, 2000; Kumaravel *et al.*, 2009).

Em trabalho realizado pelo grupo (Ronchi *et al.*, 2012), a lesão pulmonar oxidativa avaliada pelo TAP e o dano ao DNA pelo teste do cometa apresentou correlação significativamente positiva quando aferidas no sangue periférico e tecido pulmonar, sugerindo que o sangue periférico poderia ser utilizado para grandes estudos epidemiológicos conduzidos na prática clínica, quando não é possível ter acesso ao tecido alvo.

Suplementação com antioxidantes na SDRA

Tendo em vista o papel do EO na SDRA, estratégias terapêuticas envolvendo suplementação com antioxidantes têm sido consideradas. Estudo clínico mostrou que a suplementação com antioxidante (N-acetilcisteína) melhorou índices de EO plasmático (GSH, GSSG/GSH) e de gravidade (escore APACHE-II) de pacientes portadores de SDRA (Soltan-Sharifi *et al.*, 2007). A associação de antioxidantes (N-acetilcisteína e Desferoxamina) também atenuou a lesão oxidativa lipídica, proteica e a geração de radical superóxido em lavado broncoalveolar de ratos com lesão pulmonar (Ritter *et al.*, 2006), revelando outro campo para estudos no tratamento da síndrome. Outro estudo experimental (Kinniry *et al.*, 2006) observou que a suplementação com alfa-tocoferol (adicionado à ração) melhorou os níveis de peroxidação lipídica, avaliado pelo malondialdeído (MDA) pulmonar em camundongos submetidos ao modelo de SDRA experimental (instilação traqueal de ácido clorídrico). Os resultados podem, em parte, ser decorrentes da ação do alfa-tocoferol na diminuição da migração de neutrófilo para o espaço alveolar e, portanto, melhora da lesão de endotélio e de epitélio, com diminuição da expressão de molécula de adesão do neutrófilo (Rocksén, 2003) e atenuação da produção de ROS (Kinniry *et al.*, 2006). O efeito da suplementação com mistura de vitaminas (tocoferol, caroteno, ascorbato) foi também estudado em pacientes portadores de SDRA (Soltan-Sharifi *et al.*, 2007). Os resultados mostraram que os pacientes

suplementados apresentaram diminuição do tempo de internação, do tempo de desmame da VM e de evolução para disfunção de múltiplos órgãos. Apesar do uso de antioxidantes ter mostrado algum benefício na evolução da SDRA, ainda não há evidência clínica para indicar o uso rotineiro dessa estratégia.

Nos últimos anos, tem sido de grande interesse a função de proteção bioquímica de antioxidantes naturais contidos em alimentos para a prevenção de danos oxidativos causados por espécies reativas (ROS e RNS) de radicais livres (Jamshidzadeh *et al.*, 2008). Diversos estudos têm mostrado que a ingestão de tomate e seus produtos se associa com diminuição do risco de desenvolvimento de várias doenças (Rao e Agarwal, 2000; Minorsky, 2002), mas para nosso conhecimento, não existem estudos que tenham avaliado o papel do licopeno na SDRA.

O licopeno é um carotenoide lipofílico responsável pela cor vermelha de várias frutas e vegetais (Khachik *et al.*, 2002) e é abundantemente encontrado em tomates e seus produtos (Mangels *et al.*, 1993). Não possui atividade provitamina A que é relativamente resistente ao calor no processamento do tomate. Em decorrência de seu grande número de duplas ligações conjugadas, o licopeno é considerado um dos melhores antioxidantes dentre os carotenoides. Além disso, é um dos mais potentes antioxidantes encontrados no organismo humano, apresentando potência antioxidante 100 vezes maior do que a vitamina E e a vitamina C. Outro atributo do licopeno refere-se à sua altíssima capacidade de se ligar ao oxigênio *singlet* (uma ROS) (Di Mascio *et al.*, 1989), sendo melhor do que o caroteno (duas vezes) e tocoferol (10 vezes) (Agarwal e Rao, 2000). Além do oxigênio *singlet* e do radical peroxil (Stahl e Sies, 2003), tem sido mostrada forte interação entre o licopeno e outras ROS, como o peróxido de hidrogênio (Wang *et al.*, 2004), o qual pode induzir a geração de radical hidroxil, conhecido como importante ROS indutora de oxidação lipídica e de bases de DNA (Lu *et al.*, 1995). Sua proteção contra a oxidação de bases de DNA foi demonstrada por nosso grupo em cardiomiócitos de ratos Wistar suplementados com licopeno na forma licopeno-oleoresina (Ferreira *et al.*, 2007). Além da propriedade antioxidante, recentes estudos têm destacado o papel antiinflamatório do licopeno em várias doenças (Hung *et al.*, 2008; Ghavipour *et al.*, 2012; Luvizotto *et al.*, 2013).

Apesar do progresso do conhecimento da fisiopatologia da SDRA e do avanço em estratégias terapêuticas, a mortalidade permanece elevada. (Okamoto *et al.*, 1998; The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000; Fioretto *et al.*, 2001). Além disso,

sua patogênese é multifatorial e inclui alta exposição ao EO, sendo este fator determinante da progressão da doença (Ciencewicki *et al.*, 2008).

Tendo em vista os efeitos protetores da ventilação oscilatória de alta frequência sobre o metabolismo oxidativo da SDRA bem como o potencial papel antioxidante e antiinflamatório do licopeno, nossa hipótese é que esse carotenoide exerce efeito protetor adicional em modelo experimental de SDRA.

2. Objetivos

Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação com licopeno associado à ventilação oscilatória de alta frequência e à ventilação mecânica convencional protetora sobre os estados oxidativo e inflamatório resultantes da SDRA induzida em modelo experimental em coelhos.

3. Materiais e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) - sob protocolo nº 1107/2014 - da instituição e conduzido no laboratório da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP.

Obtenção, preparo e distribuição dos animais

Trata-se de estudo prospectivo, controlado, *in vivo* e em animais de laboratório. Foram utilizados coelhos machos jovens brancos fornecidos pelo Biotério da UNESP - Campus de Botucatu, com peso corporal variando de 1,5 a 3,0 Kg.

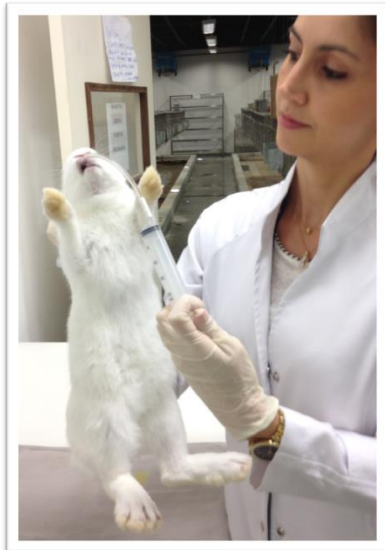
Suplementação com licopeno

Os coelhos foram adaptados no Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental durante duas semanas. Os animais foram mantidos (um animal/gaiola) sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($70 \pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12h). Água filtrada e ração (Purina®, Brasil) oferecidas *ad libitum*.

Após o período de adaptação de duas semanas, os animais sorteados para compor os grupos suplementados, receberam diariamente a solução de licopeno (solução

realizada a partir do composto Lyc-O-Mato® 6%, fornecido 10mg/Kg por meio de gavagem, durante três semanas.

As imagens abaixo demonstram a maneira como foram realizadas as gavagens, e a seringa com haste de silicone utilizada, respectivamente.



O produto suplementado contém extrato de tomate apresentando 6% de licopeno, bem como outros fitonutrientes de tomate natural (como tocoferóis, fitoeno, fitoflueno, beta-caroteno, fosfolípidos e fitoesteróis) extraídos de tomates ricos em licopeno e produzidos de acordo com os EUA patente n. ° 5 837 311 e patente da UE n. ° 844 831.

A ingestão de dieta e o peso dos animais foram registrados diariamente durante todo o período de estudo. As condições de temperatura, umidade, ciclo claro/escuro foram mantidas de maneira idêntica ao período de adaptação.

Distribuição e instrumentação dos animais

Foram utilizados no total 55 coelhos machos e jovens, da raça New Zealand.

Previamente, dez animais saudáveis foram submetidos a eutanásia para formar os grupos *BASELINE*, sendo que, cinco desses animais foram devidamente suplementados, formando então, os grupos: *baseline* sem suplementação: GBL (n=5) e *baseline* suplementado com licopeno: GBLL (n=5). Os grupos *baseline* foram idealizados para análise dos carotenoides. Mais cinco animais formaram o grupo controle de animais saudáveis submetidos à VMC Protetora, sem suplementação: GC (n=5).

Os animais restantes foram distribuídos para compor os grupos submetidos à indução da lesão pulmonar e tratamento com ventilação mecânica da seguinte maneira: lesão pulmonar submetidos à VMC protetora, suplementados com licopeno – GVMCL

(n=10) e sem suplementação – GVMC (n=10) e com lesão pulmonar submetidos à VOAF, suplementados com licopeno – GVAFL (n=10) e sem suplementação – GVAF (n=10).

Os animais foram instrumentados de acordo com técnica previamente descrita (Fioretto *et al.*, 2012; Ronchi *et al.*, 2012). Após pesagem, os animais foram anestesiados e sedados com solução de cetamina (50 mg/Kg) e acepromazina (2 mg/Kg) administradas por via intramuscular. Posteriormente, os animais receberam oxigênio a 100% por meio de cateter nasal, e colocados em goteira cirúrgica e submetidos à tricotomia cervical e torácica para colocação de eletrodos de monitorização da frequência cardíaca (FC). Se a FC diminuísse para valores abaixo de 180 bpm, era administrada atropina na dose de 0,01 mg/Kg por via intravenosa. A região anterior do pescoço dos animais foi anestesiada com xilocaína 2% para dissecção da artéria carótida e veia jugular interna. Um cateter de lúmen único (22 Gauge Jelco, Introcan Safety - B-Braun, Melsungen, Germany) foi introduzido na artéria carótida e avançado até a porção intratorácica desse vaso e outro de duplo lúmen (5^{Fr.} - Arrow International Inc., Reading, Philadelphia-USA) foi introduzido pela veia jugular interna até a junção entre o átrio direito e a veia cava superior. O cateter arterial foi utilizado para obtenção de gasometrias e para monitoração contínua da pressão arterial média (PAM) com auxílio de sistema de monitoração de pressão (Módulo de pressão invasiva Dixtal 2010-IBP, Manaus, Brasil) conectado a monitor multiparamétrico (Dixtal 2010, Manaus, Brasil). O cateter na veia cava foi utilizado para monitoração da pressão venosa central (PVC).

Obtidos os acessos vasculares, foi realizada traqueostomia e introduzido tubo traqueal de maior calibre possível (diâmetro interno de 3,0 a 3,5 mm, Portex, Hythe, UK), mantido em posição por meio de fita cirúrgica. Imediatamente, era iniciada a ventilação mecânica com o aparelho *Intermed Carefusion – Inter 7 Plus* (São Paulo-Brasil). Os parâmetros iniciais foram: frequência respiratória (FR) de 25 a 50 ciclos por minuto, ajustada de acordo com a PaCO₂; tempo inspiratório (Ti) de 0,5 segundo; pressão expiratória final positiva (PEEP) de 5 cmH₂O; fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de 1,0; e volume corrente alvo de 7 mL/Kg (modo volume controlado-pressão regulada). Estes parâmetros foram mantidos por período de estabilização de 10 minutos até o momento da indução da lesão pulmonar.

A anestesia foi mantida por meio de administração intravenosa contínua de 10 mg/Kg/h de cetamina até a conclusão do experimento. Além disso, os animais foram submetidos a bloqueio neuromuscular por meio da administração intravenosa de 0,2 mg/Kg de pancurônio, sendo o bloqueio mantido com doses adicionais de 0,1 mg/Kg a

cada 30 a 60 minutos. Caso a PAM diminuísse abaixo de 50 mmHg, era iniciada infusão intravenosa contínua de noradrenalina em dose inicial de 0,1 mcg/Kg/min.

Durante o experimento, a temperatura corporal foi monitorada com o auxílio de um termômetro de mercúrio por via retal, sendo mantida entre 38°C e 40°C com auxílio de manta térmica infravermelha (*Bioterm digital – produtos térmicos*), e a volemia foi mantida por meio de infusão contínua de 4 mL/kg/h de solução salina.

Instalação do modelo de lesão pulmonar

A lesão pulmonar foi induzida conforme técnica previamente descrita (Ronchi *et al.*, 2011; Fioretto *et al.*, 2012; Ronchi *et al.*, 2012). Resumidamente, através da cânula traqueal foram realizadas cinco lavagens sucessivas do pulmão com soro fisiológico (SF 0,9%) aquecido a 38°C em alíquotas de 30 mL/kg, a pressão máxima de 30 cmH₂O. Cada procedimento de lavagem tinha duração de 60 segundos, sendo 20 segundos reservados para infusão de salina e o tempo restante para remoção da mesma, a qual foi realizada por gravidade e movimentos externos de compressão torácica. Completada a retirada, o procedimento foi repetido a cada 3 – 5 minutos até o critério de definição de SDRA ser atingido (relação PaO₂/FiO₂ ≤ 100 mmHg). Se esta gasometria não confirmasse a relação PaO₂/FiO₂ ≤ 100 mmHg, a lavagem foi reiniciada com a realização de três outros procedimentos de lavagem antes da coleta de outra gasometria e assim sucessivamente. Atingido este critério, o momento foi denominado tempo zero (T0), compondo, assim, os animais para seus respectivos grupos.

De acordo com o comportamento das variáveis analisadas em outros estudos que utilizaram metodologia semelhante, foram estudados 10 coelhos por grupo em tratamento (Imai *et al.*, 2001; Rotta *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2006; Ronchi *et al.*, 2011; Ronchi *et al.*, 2012).

Formação dos grupos experimentais

Resumidamente, formaram-se sete grupos experimentais:

- Sádios sem ventilação e sem suplementação (GBL: n=5)
- Sádios sem ventilação e suplementados com licopeno (GBLL: n=5)
- Sádios submetidos à VMC Protetora e sem suplementação (GC: n=5)
- Lesão pulmonar (LP) submetidos à VMC Protetora e suplementados com licopeno (GVMCL: n=10)

- LP submetidos à VMC Protetora sem suplementação (GVMC: n=10)
- LP submetidos à VOAF e suplementados com licopeno (GVAFL: n=10)
- LP submetidos à VOAF sem suplementação (GVAF: n=10)

Nos animais dos grupos sob VMC, com ou sem suplementação de licopeno, a PEEP inicialmente foi mantida à 5 cmH₂O. Após a lesão pulmonar foi aumentada para 8 cmH₂O durante a primeira hora e, elevando gradativamente até 10 cmH₂O nas três horas seguintes, para minimizar a hipotensão sistêmica. A VOAF foi fornecida pelo oscilador SensorMedics 3100A (*Viasys Healthcare, Yorba Linda, USA*) com pressão média de via aérea de 14 cmH₂O, Ti de 33%, FR de 10 Hz e amplitude necessária para manter PaCO₂ em níveis fisiológicos. A FiO₂ foi mantida em 1,0 para todos os animais até o final do experimento, conforme outros trabalhos de nosso grupo que empregaram metodologia semelhante (Ronchi *et al.*, 2011; Fioretto *et al.*, 2012; Ronchi *et al.*, 2012). Após a confirmação do modelo, as gasometrias foram realizadas a cada 30 minutos pelas 4 horas de duração do protocolo experimental.

Desenho do protocolo

A figura 1 mostra o desenho do protocolo para indução de lesão pulmonar e manutenção da ventilação mecânica durante as 4 horas do experimento para os grupos GC, GVMCL, GVMC, GVAFL e GVAF.

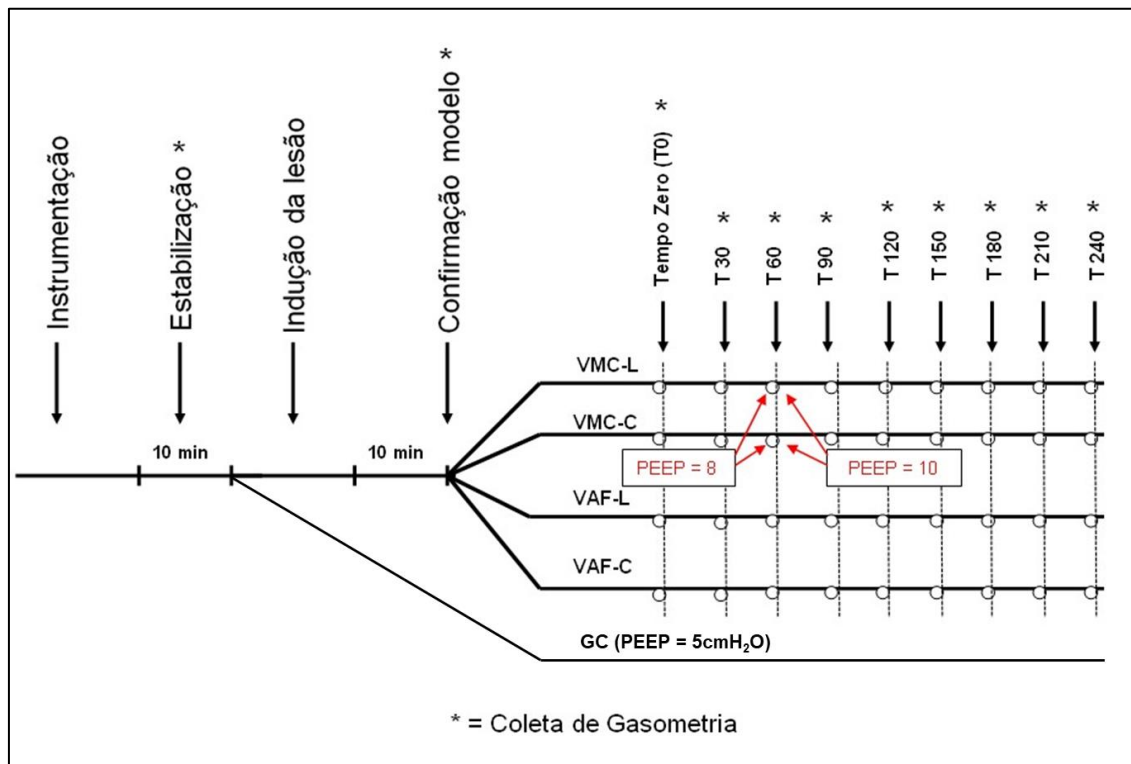


Figura 1: Protocolo experimental e distribuição dos animais com lesão pulmonar de acordo com a ventilação utilizada, com ou sem a administração do licopeno. VMC-L: ventilação mecânica convencional com suplementação; VMC-C: ventilação mecânica convencional sem suplementação; VAF-L: ventilação oscilatória de alta frequência com suplementação; VAF-C: ventilação oscilatória de alta frequência sem suplementação; PEEP: pressão positiva expiratória final e T: tempo em minutos.

Manipulação dos pulmões

Antes do término do experimento, os animais receberam 1 mL de heparina e foram submetidos a eutanásia com a administração intravenosa rápida de cetamina. Em seguida, o tubo traqueal foi ocluído e o tórax aberto para excluir a presença de pneumotórax oculto, confirmar a posição dos cateteres vasculares e do tubo traqueal e coletar amostras para as análises histológicas e lavado broncoalveolar (BAL) da porção esquerda do pulmão, e da porção direita foram coletadas amostras para análises da capacidade antioxidante pulmonar (TAP) e lesão oxidativa do DNA (teste do cometa). A traqueia foi ligada com cadarço, abaixo da porção terminal da cânula traqueal. O bloco pulmão/coração foi

removido e o pulmão esquerdo foi lavado duas vezes utilizando alíquota de 15 mL/Kg de salina. O fluido drenado foi coletado para análise do BAL.

Histologia pulmonar

Após a remoção do pulmão esquerdo e lavagem com solução salina, o pulmão foi embebido na solução de formol a 10%, por um período de fixação de 1 a 4 horas, em seguida, foram realizados os cortes e esses fragmentos foram colocados nos cassetes para permanência “overnight” no Processador de Tecidos de Bancada (*Leica 1020*). Posteriormente, os tecidos foram corados com hematoxilina-eosina e examinados por patologista, de forma cega e independente. Os achados histológicos foram medidos por meio de alguns parâmetros de lesão pulmonar, com um sistema de pontuação que avalia cinco itens: neutrófilos no espaço alveolar; neutrófilos no espaço intersticial; membranas hialinas; resíduos proteicos que ocupam os espaços aéreos e espessamento do septo alveolar, e em seguida, quantificadas (*American Thoracic Society, 2011*).

Contagem de células polimorfonucleares no fluido de lavagem pulmonar

Para avaliar a inflamação pulmonar foram contadas as células totais do BAL, o qual foi coletado a partir da lavagem com solução salina da porção esquerda do pulmão. Essa análise foi realizada por meio da câmara de Newbauer. O volume de lavado broncoalveolar foi medido e centrifugado. As células obtidas por centrifugação foram suspensas novamente em 1 mL de salina e depois diluídas 1:10 em solução de Turck para contagem dos leucócitos. A contagem diferencial foi realizada em esfregaço da mesma amostra de células, em lâminas e foram coradas por corante panótico. A fixação das células em lâminas foi realizada por meio de citocentrifugação.

Procedimento com o sangue coletado

O sangue coletado foi transferido para tubos contendo EDTA. Esses tubos foram colocados nas centrífugas e, após centrifugação ($2500 \times g$ a 4°C por 10 minutos), o plasma obtido foi armazenado em freezer a -80°C para posteriormente realizar dosagens da concentração de carotenoides e TAP. O sangue destinado para a determinação de lesões oxidativas do DNA (teste do cometa) foi coletado em tubo com EDTA e imediatamente processado.

Análise dos carotenoides presentes na dieta

A dieta foi analisada segundo descrito previamente (Ferreira *et al.*, 2000). Para cada 10 g de dieta, 5 mL de H₂O foram adicionados e misturados por meio de movimentos giratórios durante um minuto. A solução de extração [30 mL; hexano/acetona/etanol/tolueno (50:35:30:35)] foi adicionada e misturada por um minuto, seguido por 16 horas de repouso sob luz vermelha à temperatura ambiente; 4 mL de 40% KOH metanólico e hexano (30 mL) foram adicionados e a mistura deixada no escuro à temperatura ambiente. Após 1 hora, 10% Na₂SO₄ (30 mL) foi adicionado, agitado e deixado no escuro à temperatura ambiente. Após 1 hora, a camada de hexano coletada e o volume foram registrados. Alíquotas de 200 µL foram evaporadas completamente sob N₂ e o resíduo dissolvido novamente em 100 µL etanol, *vortexado* e sonicado por 30 segundos. Alíquotas de 50µL do extrato final foram injetadas no sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Assim, para confirmar a ingestão de licopeno, a aferição foi feita no plasma, por meio desse método de cromatografia líquida de alta eficiência.

Análise do licopeno no plasma

Para análise do licopeno foram utilizados 400 µL de plasma, 100 µL de padrão interno (equinenona), clorofórmio/metanol CHCl₃/CH₃OH (3mL; 2:1, v/v) e 500 µL de salina 8.5 g/L). Após centrifugação (3000 rpm por 10 minutos) o sobrenadante foi coletado e reservado. O hexano foi adicionado após a coleta do sobrenadante. As camadas clorofórmicas e hexânicas foram evaporadas sob nitrogênio e o resíduo ressuspenso em 100 µL de etanol, *vortexado* e sonicado por 30 segundos e 50µL desta alíquota foram utilizadas na análise pelo HPLC (Waters 2996 com detector de 340 nm para retinóides e 450 para carotenoides). A fase móvel utilizada foi metanol/metiltertbutiléter/ água (83:15:2, v/v/v, 15 g/L com acetato de amônio em água, solvente A) e metanol/metiltretbutiléter/água (8:90:2, v/v/v, 10 g/L com acetato de amônio em água, solvente B). O fluxo foi de 1mL/ min sendo: 1) 100% de solvente A por 2 min. seguido por 6 min. de gradiente linear com 70% de solvente A; 2) espera 3min. depois 10 min. de gradiente linear com 45% solvente de A; 3) espera 2 min., depois 10min de gradiente linear com 5% de solvente A; 4) espera 4 min. depois 2min. de gradiente linear voltando para 100% de solvente A (Ferreira *et al.*, 2007). Para a quantificação dos cromatogramas, foi realizada a comparação entre as relações área da substância/área do padrão interno,

obtidas na análise. Os valores das substâncias da solução padrão foram corrigidos por seus coeficientes de extinção molar.

Determinação da lesão oxidativa do DNA no plasma

A lesão oxidativa do DNA nos linfócitos (isolados imediatamente após a coleta do sangue) foi realizada pelo ensaio cometa que avalia os danos gerais e oxidativos no DNA, de acordo com metodologia descrita previamente (Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1998; Ronchi *et al.*, 2012). Três tipos de lesão de bases do DNA foram avaliadas (SBs, purinas oxidadas e pirimidinas oxidadas). O tipo SBs (quebras de fita simples e duplas do DNA em sítios alcali-lábeis) avalia a lesão de bases do DNA de amostras tratadas com solução tampão. O tipo SBs determina as lesões gerais desencadeadas ou não por estresse oxidativo. O tipo purinas oxidadas foi avaliado utilizando a enzima formamidopirimidina-DNA glicosilase (FPG), que cliva purinas oxidadas. Enquanto que para o tipo pirimidinas oxidadas, foi utilizada a enzima endonuclease III (endoIII), que detecta pirimidinas oxidadas.

Resumidamente, alíquotas de 10µL de amostra foram adicionadas, respectivamente, a 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Cada uma das alíquotas foi colocada sobre lâmina previamente recoberta com camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%), coberta com lamínula e colocada a 4°C, por 10 minutos, para solidificação da agarose. Após esse período, a lamínula foi removida e a lâmina colocada em solução de lise gelada e recém preparada (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, pH 10, Triton X-100 a 1% e DMSO a 10%) por 2 horas. Após, as lâminas foram lavadas em PBS (livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}) por 5 minutos. O tratamento de ambas enzimas foi realizado em diluição 1:1000 e as lâminas permaneceram por 30 minutos em estufa a 37°C para ação da FPG e endoIII, em seguida, resfriada à 4°C por 10 minutos. As lâminas foram transferidas para cuba horizontal de eletroforese, que foi preenchida com tampão alcalino gelado e recém preparado (1mM EDTA e 300mM NaOH, pH>13). Após período de 40 minutos para desespiralização do DNA e expressão dos sítios álcali-lábeis, a eletroforese foi conduzida a 25V por 30 min. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram colocadas por 15 min. em solução de neutralização (0,4M de Tris, pH 7,5), fixadas com etanol absoluto, secas à temperatura ambiente e armazenadas a 4°C. No momento da análise, as lâminas foram coradas com 80µl de solução de syber Gold, cobertas com lamínulas, e os nucleoides visualizados em microscópio de fluorescência (aumento de

400X) acoplado ao sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV – Perceptive Instruments*, UK). O teste foi realizado em duplicata, cada passo foi realizado sob luz indireta, com lâminas codificadas e analisadas em teste cego, utilizando-se o parâmetro “tail intensity” (% de DNA na cauda).

Determinação da lesão oxidativa pulmonar

O estresse oxidativo foi avaliado pelo método da TAP descrito por Aldini et al. (Aldini *et al.*, 2001). O método é baseado na oxidação de análogo lipofílico (probe) denominado BODIPY [ác.4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-undecanóico] e por meio de um gerador de radical lipoperoxil (LOO) de compartimento lipofílico denominado MeO-AMVN [2,2¢-azobis(4-methoxi-2,4-dimetil-valero-nitrilo)]. A oxidação do BODIPY origina um produto de fluorescência verde que pode ser detectado em Contador de Emissão de Luz Fluorescente. O ácido (BODIPY 581/591) foi fornecido pela Molecular Probes (Eugene, OR, USA) e MeO-AMVN, obtido da Wako Chemicals (Richmond, VA, USA). As etapas do método são detalhadas a seguir.

Preparação dos lipossomas

Os fosfolípides foram dissolvidos em clorofórmio e evaporados muito lentamente sob baixo fluxo de nitrogênio, associado ao rolamento do frasco, objetivando obter depósito fino de um filme. Este filme foi reidratado com tampão salina (PBS, 40 mM, pH 7,4) a uma concentração de 2,5 mg de fosfolípide/mL, congelado e derretido por 3 vezes, seguindo-se por sonicação (Branson Sonifer 450, Danbrrry, CT, USA) sob gelo por 30 segundos, por 3 vezes.

Efeito da lesão pulmonar sobre a capacidade antioxidante total (TAP)

O método TAP foi aplicado para avaliação do estado antioxidante do pulmão. Foram utilizados fragmentos de tecido pulmonar (porção direita) para esta análise, o qual foi quantificado comparando a AUC (*area under the curve*) relativa à cinética de oxidação do BODIPY em relação à suspensão do PC (fosfatidilcolina) usada como referência de matriz lipídica (Beretta *et al.*, 2006). Posteriormente, foi corrigido por grama de proteína de tecido pulmonar e o método BCA foi usado para determinar a concentração de proteína.

Como relatado por Ronchi et al., em nosso laboratório, (Ronchi *et al.*, 2011; Ronchi *et al.*, 2012), utilizamos 400 mg de tecido pulmonar para realizar a técnica. Foi colocado 2mL de tampão no tecido para homogeneizá-lo, utilizando apenas 200µL do

sobrenadante formado. Após, adicionar 200µL de PBS e 100µL de BODIPY, vortexando gentilmente por 10 segundos a uma baixa velocidade, seguido por incubação em banho-maria a 37°C. Após incubação, PBS gelado (485 µL) foi adicionado e a solução foi vortexada gentilmente por 10 segundos à baixa temperatura. O gerador de radical MeO-AMVN (15 µL, concentração final de 2 mM) foi adicionado na mistura e vortexado gentilmente. A oxidação da amostra do tecido foi monitorada por meio de produto de oxidação de fluorescência verde do BODIPY 581/591 (concentração final ex = 500, em = 520 nm, fenda 10 nm) usando um contador (Wallac Vitor 2, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Variáveis analisadas

Protocolo com as variáveis que foram anotadas para cada animal está anexado após as referências bibliográficas. Resumidamente, foram analisadas:

- a) Variáveis hemodinâmicas: frequência cardíaca e pressão arterial média;
- b) Gasometria arterial: pH, PaO₂, PaCO₂, HCO₃⁻, BE e SaO₂;
- c) Parâmetros ventilatórios: pressão inspiratória; pressão expiratória final positiva, fração inspirada de oxigênio, volume corrente, tempo inspiratório, frequência respiratória, pressão média das vias aéreas e amplitude de pressão;
- d) Mecânica pulmonar: complacência pulmonar estática na VMC;
- e) Dano oxidativo pulmonar: capacidade antioxidante total (TAP);
- f) Lesão oxidativa do DNA: teste do cometa;
- g) Índice para avaliar trocas gasosas: relação PaO₂/FiO₂
- h) Processo inflamatório alveolar: contagem de polimorfonucleares no fluido do BAL;
- i) Histologia

Análise estatística

Variáveis com distribuição normal foram comparadas entre os diversos grupos experimentais por meio de Análise de Variância (ANOVA), com subseqüentes comparações múltiplas entre pares por meio do teste de Student-Newman-Keuls. Variáveis de distribuição não normal foram comparadas entre os diversos grupos por meio de ANOVA de Kruskal-Wallis, com subseqüentes comparações pelo teste de Dunn. A análise do comportamento de uma variável ao longo do tempo foi realizada pela análise de medidas repetidas de Friedman, com comparações posteriores pelo método de Dunnett.

Foi utilizado nível de significância de 5%. O programa estatístico utilizado para o armazenamento e análise dos dados foi o SigmaPlot 11.0.

4. Resultados

A concentração sérica do licopeno está apresentada na Tabela 1. A análise dos resultados mostrou que a suplementação com o licopeno aumentou significativamente as concentrações plasmáticas.

Tabela 1. Concentração plasmática do licopeno (ug/dL)

GRUPO	SEM SUPLEMENTAÇÃO	COM SUPLEMENTAÇÃO
GVMC	0	1,272
GVAF	0	1,024
BASAL (GBL/GBLL)	0	1,039

Os dados estão expressos em média. GVMC: grupo ventilação mecânica convencional; GVAF: grupo ventilação oscilatória de alta frequência; Basal: correspondendo aos grupos GBL (grupo baseline sem licopeno) e GBLL (grupo baseline com licopeno). $p < 0,05$

Os grupos mostraram-se homogêneos quanto ao peso corporal dos animais ($2,6 \pm 0,2$ kg) e ao número de lavagens necessárias para a indução da lesão (média de 6 lavagens/grupo).

Comparando-se os momentos antes e depois da indução da lesão pulmonar, em cada grupo, em relação à PaO_2/FiO_2 e quanto à complacência pulmonar estática, não houve diferença estatística entre os grupos. Ao contrário, comparando os momentos, antes e depois da lesão pulmonar em cada grupo, houve piora significativa da oxigenação e também diminuição da complacência pulmonar estática em todos os grupos após a indução da lesão (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação dos momentos antes e depois da lesão pulmonar em cada grupo quanto à relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e complacência pulmonar estática.

Variáveis	GC n=5 Valores Basais	GVMC n=10		GVAF n=10		GVMCL n=10		GVAFL n=10	
		Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	469,2±56,1	377,4±49,7	68,0±18,1*	474,5±86,7	67,4±18,4*	461,9±57,9	70,0±21,3*	476,3±92,3	78,6±19,3*
Complacência									
Pulmonar (mL/cmH ₂ O)	2,50±0,77	2,09±0,41	0,68±0,36*	2,50±0,38	0,46±0,25*	3,20±0,63	0,63±0,38*	2,36±0,41	0,66±0,35*

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. n: número de animais; $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$: Relação entre a pressão parcial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio; GVMC: grupo ventilação mecânica convencional sem suplementação; GVAF: grupo ventilação oscilatória de alta frequência sem suplementação; GVMCL: grupo ventilação mecânica convencional suplementado com lícopeno; GVAFL: grupo ventilação oscilatória de alta frequência suplementado com lícopeno. ANOVA para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes complementados com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni (Johnson e Wichern, 2007) *: $p < 0,05$, comparando antes e depois, dentro de cada grupo.

Da mesma forma, hemodinamicamente, não houve diferença estatística quanto a pressão arterial média (PAM) quando foram comparados os momentos antes e depois da indução da lesão pulmonar e os grupos, indicando homogeneização dos grupos e o controle rigoroso dessa variável, utilizando quando necessário, drogas vasoativas.

Depois da indução da lesão pulmonar, no momento T0 (Figura 2), os grupos evoluíram com hipoxemia significativa em relação ao início do experimento. Após 4 horas de VM, os grupos tratados com VOAF, com e sem licopeno, e o grupo sob VMC protetora com licopeno, apresentaram melhora significativa em relação ao grupo VMC protetora sem suplementação, com relação de PaO_2/FiO_2 semelhante aos momentos antes da indução da lesão pulmonar e em relação ao GC, como mostra a figura 2.

Além disso, os grupos GC, VAF e VAFL diferem estatisticamente dos grupos VCML e VMC no tempo 30.

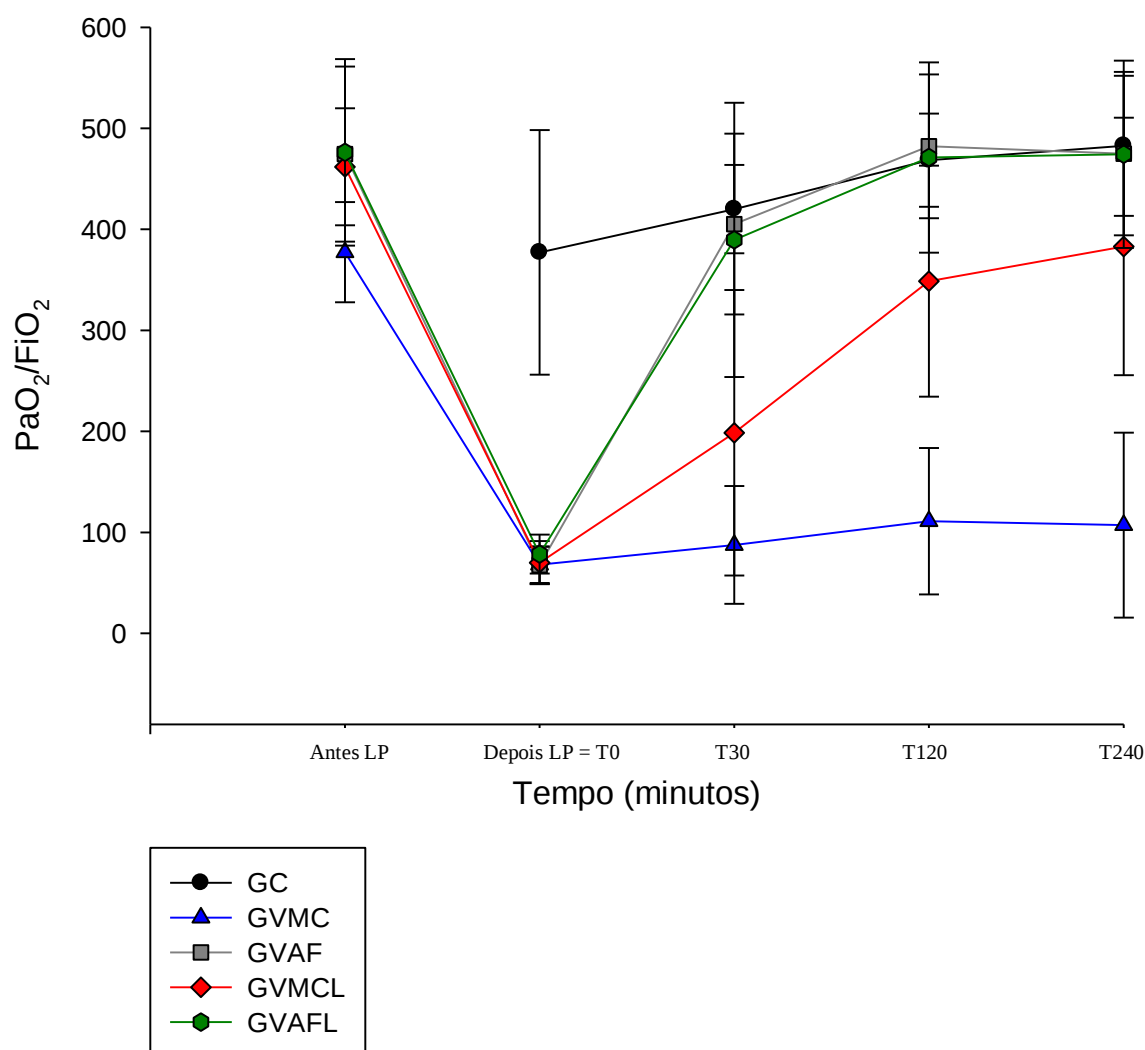


Figura 2. Evolução da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ no período experimental de 4 horas. Houve diferença significativa entre o GC, GVAFL, GVAFL, GVMCL quando comparado com GVMC no tempo T0. No momento T240 a diferença estatística esteve entre o GVMC e os demais grupos. $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$: Relação entre a pressão parcial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio; LP: lesão pulmonar; GVMC: grupo ventilação mecânica convencional sem suplementação; GVAFL: grupo ventilação oscilatória de alta frequência sem suplementação; GVMCL: grupo ventilação mecânica convencional suplementado com licopeno; GVAFL: grupo ventilação oscilatória de alta frequência suplementado com licopeno. Testes estatísticos: ANOVA de medidas repetidas em grupos independentes complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

A contagem de neutrófilos no BAL mostrou que os grupos GVMCL e GVAFL, ou seja, os animais que foram suplementados com licopeno, apresentaram valores significativamente menores em comparação com os animais sem suplementação, como ilustrado na figura 3.

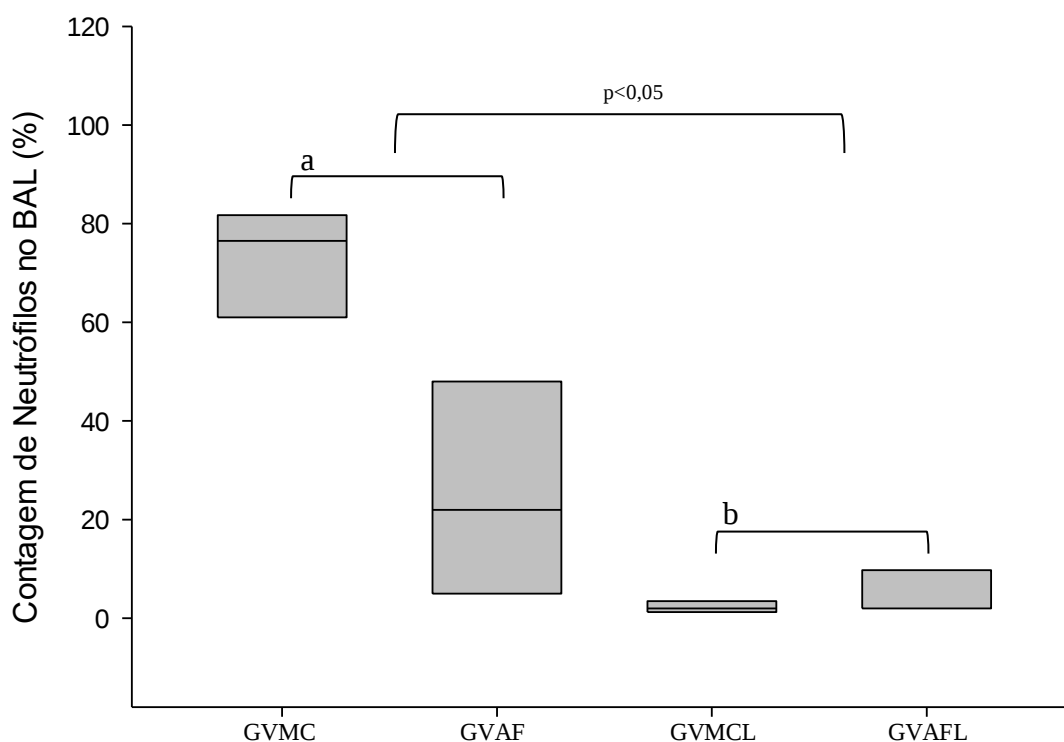


Figura 3. Porcentagem de neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar (BAL). Os grupos GVMC (76,5±17,5) e GVAF (22±38) não diferem entre si. Os grupos GVMCL (2±1,5) e GVAFL (5,5±7,5) também não diferem entre si. Porém ‘a’ apresenta valores maiores comparados com ‘b’. GVMC: grupo ventilação mecânica convencional sem suplementação; GVAF: grupo ventilação oscilatória de alta frequência sem suplementação; GVMCL: grupo ventilação mecânica convencional suplementado com licopeno; GVAFL: grupo ventilação oscilatória de alta frequência suplementado com licopeno. Teste estatístico: técnica da análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn.

O grupo controle e os grupos suplementados com licopeno (GVAFL e GVMCL) apresentaram escore de lesão histológica significativamente menor quando comparados com os grupos sem suplementação (figuras 4 e 5).

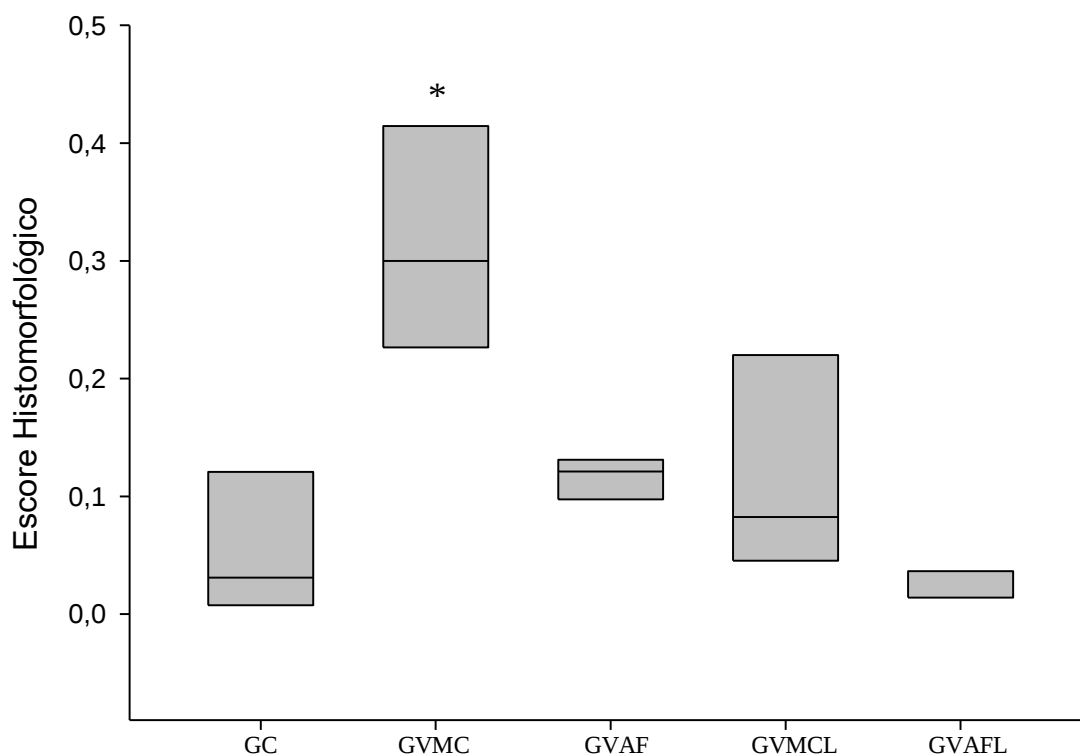


Figura 4. Escore de lesão histopatológica no tecido pulmonar. Os dados são apresentados na forma de boxplot e seus valores de mediana. Os grupos GC: 0,031 (0,01;0,09), GVAFL: 0,025 (0,01;0,03) e GVMCL: 0,082 (0,04;0,16) apresentaram valores significativamente menores diferindo do GVMC: 0,30 (0,24;0,38), porém o GVAFL: 0,121 (0,10;0,13) não difere estatisticamente dos grupos anteriores, ao nível de significância de 5%. GC: grupo controle; GVMC: grupo ventilação mecânica convencional sem suplementação; GVAFL: grupo ventilação oscilatória de alta frequência sem suplementação; GVMCL: grupo ventilação mecânica convencional suplementado com licopeno; GVAFL: grupo ventilação oscilatória de alta frequência suplementado com licopeno. Teste estatístico: ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn.

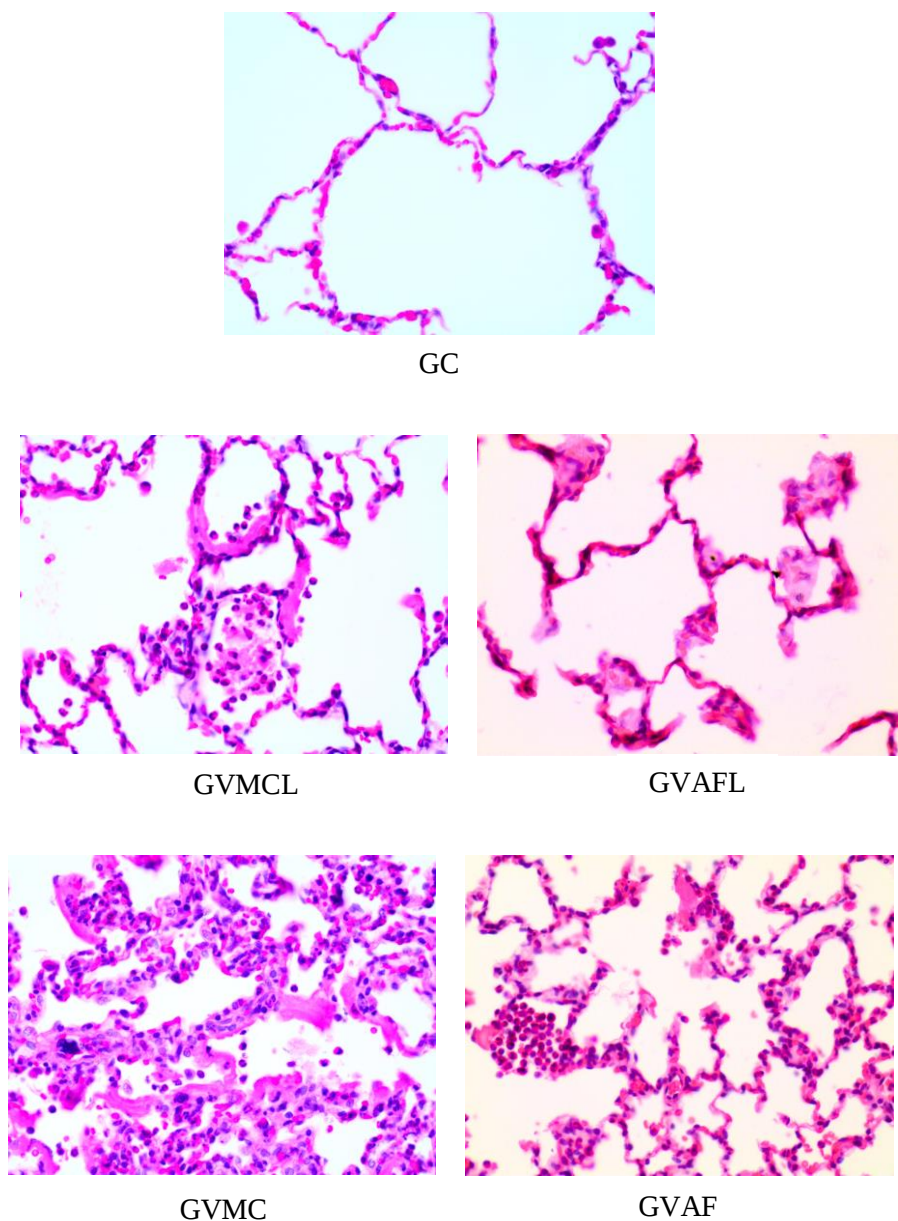


Figura 5: Imagens de amostras representativas de áreas pulmonares do grupo controle (GC), grupo ventilação mecânica convencional com suplementação (GVMCL), grupo de ventilação de alta frequência com suplementação (GVAFL) grupo ventilação mecânica convencional (GVMC), grupo de ventilação de alta frequência (GVAF). Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartilico). ANOVA Kruskal-Wallis, com comparações subsequentes pelo teste de Dunn.

Quanto ao estresse oxidativo, avaliada pela TAP no tecido pulmonar, não houve diferença estatística entre os grupos, como mostra a figura 6.

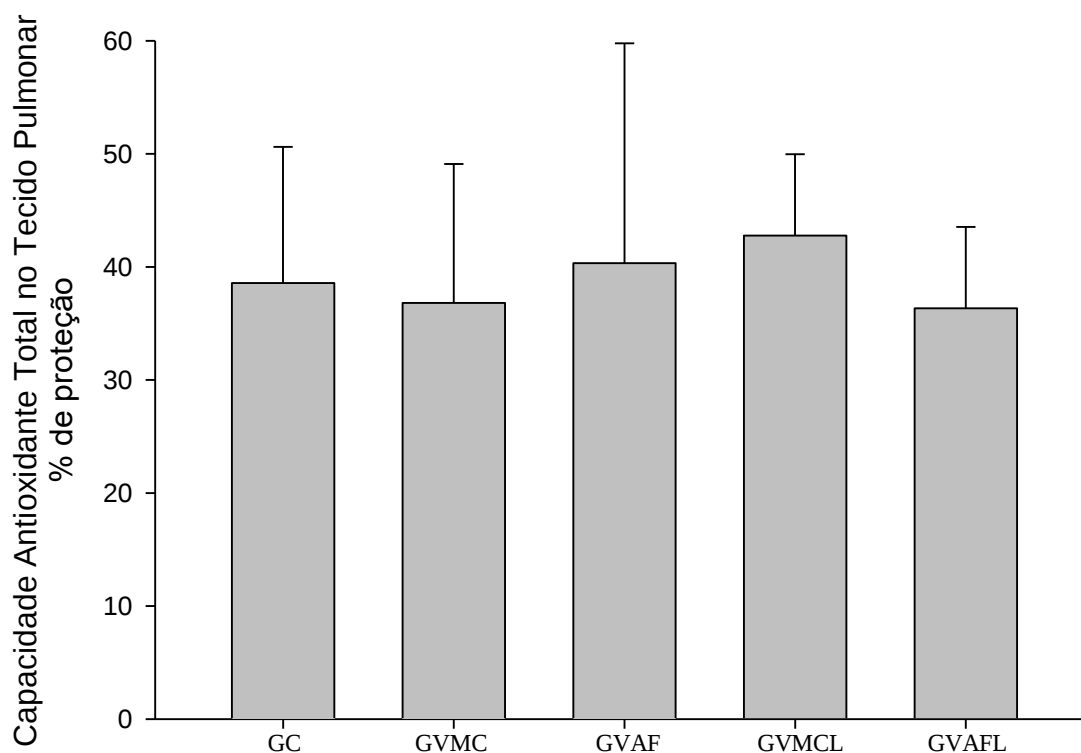


Figura 6. Proteção pulmonar determinada pela capacidade antioxidante total no tecido pulmonar, para os grupos experimentais. GC: grupo controle; GVMC: grupo ventilação mecânica convencional sem suplementação; GVAFL: grupo ventilação oscilatória de alta frequência sem suplementação; GVMCL: grupo ventilação mecânica convencional suplementado com licopeno; GVAFL: grupo ventilação oscilatória de alta frequência suplementado com licopeno. Teste estatístico: técnica de análise de variância para o modelo de um fator complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey; $p > 0,05$

A análise dano do DNA nos linfócitos não evidenciou diferença significativa comparando os grupos entre os diferentes modos de ventilação. Entretanto, houve diferença estatística comparando os animais sob ventilação convencional protetora com e sem suplementação de licopeno. O dano do DNA foi significativamente mais baixo nos animais suplementados com licopeno (GVMCL: $29,71 \pm 9,21$ < GVMC: $56,07 \pm 14,39$; $p < 0,05$), como mostra a figura 7.

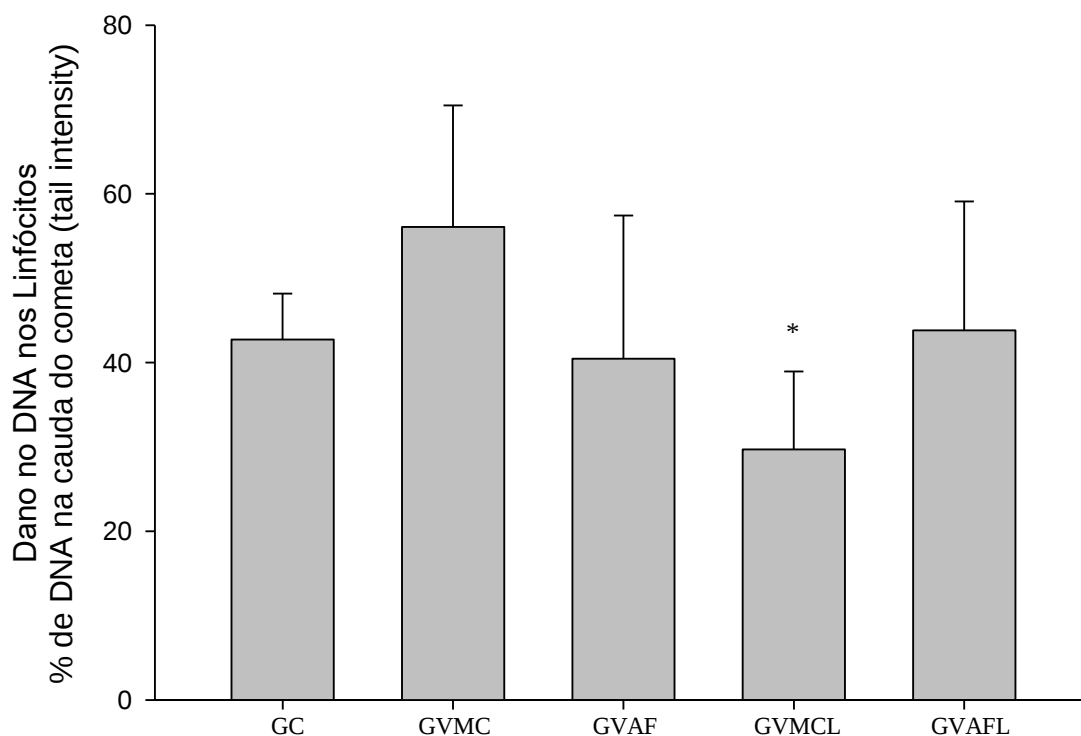


Figura 7. Dano do DNA nos linfócitos, avaliado pela porcentagem de DNA na cauda (teste do cometa - tail intensity). Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. *: $p < 0,05$ comparando GVMC com GVMCL. GC: grupo controle; GVMC: grupo ventilação mecânica convencional sem suplementação; GVAFL: grupo ventilação oscilatória de alta frequência sem suplementação; GVMCL: grupo ventilação mecânica convencional suplementado com licopeno; GVAFL: grupo ventilação oscilatória de alta frequência suplementado com licopeno. Teste estatístico: técnica de análise de variância para o modelo de um fator complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey.

5. Discussão

Inúmeros benefícios do licopeno já são conhecidos (*Rao e Agarwal, 2000; Minorsky, 2002*), como por exemplo atividade antiinflamatória e capacidade antioxidante. Mesmo sendo considerado um dos melhores carotenoides, por sua capacidade de atuar como captadores de radicais livres (*Del Giudice et al., 2016*), ainda há poucos estudos que tenham avaliado o papel do licopeno na lesão pulmonar aguda experimental.

Recentemente, o grupo evidenciou a presença de EO em modelo experimental de LPA, demonstrando maior defesa antioxidante e menor dano no DNA nos grupos tratados com VOAF (*Ronchi et al., 2012*). Conhecendo os efeitos protetores desse modo ventilatório não convencional sobre o metabolismo oxidativo da SDRA, bem como o potente papel antioxidante do licopeno, consideramos que o licopeno pudesse exercer efeito protetor em modelo experimental de LPA induzida em coelhos.

Em estudos anteriores, clínicos e experimentais, foi demonstrado que a VOAF melhora mais rapidamente a oxigenação quando comparada com a VMC (*Ben Jaballah, 2006; Derdak, 2002; Ronchi, 2011*). No presente estudo, observamos que os animais previamente suplementados com licopeno e que estavam sob VMC apresentaram oxigenação equivalente aos animais submetidos a VOAF, demonstrando que a administração do licopeno melhorou a oxigenação de forma semelhante nos grupos, independentemente do modo ventilatório empregado. Além disso, o grupo VMCL apresentou rápida recuperação, revertendo a hipoxemia após a indução da lesão, mesmo comportamento apresentado pelos animais ventilados com VOAF. Em vista da ausência de estudos até o momento, nossos resultados não podem ser comparados.

Interessante observar que a suplementação de licopeno não mostrou vantagem adicional em relação à oxigenação ao final do experimento entre os grupos sob VOAF (GVAF e GVAFL), evidenciando que esse tipo de ventilação alcança benefícios consistentes por si só.

O estudo ANTIOZ avaliou a suplementação de licopeno em relação aos efeitos da exposição do pulmão ao ozônio. Por meio de ensaio clínico randomizado, relatou-se que houve melhora da função pulmonar nos indivíduos que ingeriram suco de vegetais em comparação ao grupo placebo, protegendo, assim, o pulmão contra efeitos adversos do gás (*Samet et al., 2001*). Esses resultados poderiam ser explicados pela ação do licopeno presente nos fluidos do revestimento epitelial do pulmão, bem como dentro das células, fornecendo níveis adicionais de proteção (*Arab et al., 2002*).

Em nosso estudo, avaliamos a inflamação por meio da contagem de células polimorfonucleares (PMN), no fluido do BAL, evidenciando que os animais suplementados com licopeno apresentaram número de PMN estatisticamente menores em relação aos animais dos grupos VAF e VMC (sem suplementação). Em estudo recente do nosso grupo (*Fioretto et al., 2017*), comparamos a contagem de neutrófilos entre três grupos de animais com lesão pulmonar aguda: 1) grupo controle sem lesão pulmonar e sob VMC; 2) animais com lesão pulmonar ventilados com VOAF e 3) animais sob VMC protetora. Os coelhos dos grupos com lesão pulmonar foram mantidos em posição prona. Não obtivemos diferença estatística entre os grupos com lesão pulmonar, porém esses animais apresentaram valores estatisticamente maiores quando comparados ao grupo controle. Sugerimos, avaliando o conjunto dos achados no estudo atual e do anterior, que o licopeno diminuiu a inflamação pulmonar.

Confirmando o papel antiinflamatório do licopeno, Bae et al. avaliaram o papel protetor do carotenoide em células endoteliais primárias de veias umbilicais humanas ativadas por lipopolissacárides (LPS). O estudo demonstrou inibição das respostas proinflamatórias induzidas por LPS com o licopeno e aumento da integridade da barreira alvéolo capilar a partir de um estágio anterior à agressão.

Ao longo dos últimos anos, estudos evidenciaram a associação de EO nas doenças graves em pacientes críticos. (*Koekkoek e van Zanten, 2016*). Tal fato ocorre especialmente devido a diminuição da perfusão tecidual com aumento da quantidade de oxidantes presentes no organismo (*Goodyear-Bruch e Pierce, 2002*).

De acordo com alguns estudos epidemiológicos, há associação da ingestão de carotenoides, especialmente o licopeno e o β -caroteno, estabelecendo-se associação entre maiores concentrações dos carotenoides nos tecidos e baixo risco de doenças. Isso ocorre principalmente pelas propriedades antioxidantes do licopeno, porém outros mecanismos podem ser destacados, como por exemplo regulação do crescimento celular e modulação da expressão gênica e da resposta imune (*Rao e Rao, 2007*).

Em nosso estudo, os grupos suplementados (GVAFL e GVMCL) apresentaram menor dano histológico no tecido pulmonar quando comparados aos animais sem suplementação. Até onde constatamos, não há relatos na literatura que tenha avaliado o dano histológico pulmonar relacionado à suplementação de licopeno na lesão pulmonar aguda experimental.

Curiosamente, nossos resultados mostraram que a suplementação do licopeno e a utilização da VMC protetora leva a benefícios bioquímicos e histopatológicos similares

àqueles exibidos pela utilização isolada da VOA em modelo experimental de lesão pulmonar (*Arab et al., 2002; Fioretto et al., 2009*).

Neste estudo, a análise do dano no DNA demonstrou quebras da cadeia de DNA. O GVMC suplementado com licopeno apresentou dano significativamente menor em relação ao grupo sem suplementação, no mesmo modo ventilatório. Esse resultado sugere que a suplementação de licopeno pode ser uma terapia adjuvante adicional à VMC Protetora (*Hemmila e Napolitano, 2006*). Até onde constatamos, não há relatos na literatura que tenha avaliado o dano histológico pulmonar quanto à suplementação de licopeno na SDRA.

Embora haja muitos estudos avaliando os desfechos da SDRA grave bem como o avanço nos tratamentos, com ênfase na ventilação mecânica (*Mireles-Cabodevila, 2016; Davies, 2016*) e posição prona (*Gattinoni, 2013; Guérin, 2013; Marini, 2016*), ainda há poucos estudos abordando a relação entre o licopeno e a proteção oxidativa nos pulmões. Igualmente, há poucos estudos que tenham avaliado a dosagem de antioxidantes à serem administrados em pacientes críticos, tal como a dose ideal para diferentes tipos de terapias nutricionais, como a nutrição enteral e a parenteral.

O tomate, fonte natural de carotenoides, é um dos frutos mais consumidos no mundo (*Del Giudice et al., 2016*) e que apresenta características bioquímicas bem definidas (*Arab et al., 2002*) com papel biológico importante na prevenção e tratamento de síndromes graves. Porém, é importante ressaltar que a absorção do licopeno a partir de fontes alimentares depende de fatores como temperatura e tempo de cozimento, além da presença de lipídios ou compostos lipossolúveis (*Rao e Rao, 2007*).

Limitações do estudo

Uma das limitações desse modelo de lesão pulmonar é o tempo de duração do experimento, limitado a quatro horas, em vista da viabilidade dos coelhos. A limitação de tempo de exposição aos diferentes modos ventilatórios poderia ter impedido a expressão completa dos efeitos do licopeno. Além disso, os animais ficaram submetidos a FiO_2 de 1,0 durante esse período, fator potencialmente causador de lesões no parênquima pulmonar com interferência no metabolismo oxidativo. Porém, foi utilizada a mesma concentração de oxigênio para todos os grupos pelo mesmo tempo, possivelmente excluindo variações entre os eles devido à toxicidade de oxigênio similar.

5. Conclusões

A suplementação com licopeno reduz o número de células inflamatórias e a lesão histopatológica pulmonar, independentemente do modo ventilatório associado. Além disso, o licopeno pode auxiliar na melhora da oxigenação e na redução do dano ao DNA quando associada à VMC protetora em comparação ao uso isolado da VMC protetora.

6. Referências Bibliográficas

- Abraham E, *et al.* Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; v. 279, n. 6, p. L1137-45.
- Agarwal S, A V Rao. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Cmaj.* 2000; v. 163, n. 6, p. 739-44.
- Aldini, G, *et al.* Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med Res Rev.* 2007; v. 27, n. 6, p. 817-68.
- Aldini, G, *et al.* A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med.* 2001; v. 31, n. 9, p. 1043-50.
- Allardet-Servent J, *et al.* High-frequency percussive ventilation attenuates lung injury in a rabbit model of gastric juice aspiration. *Intensive Care Med.* 2008; v. 34, n. 1, p. 91-100.
- Amato MB, *et al.* Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 1998; v. 338, n. 6, p. 347-54.
- Arab L, *et al.* Lycopene and the Lung. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 2002.
- Arnold JH, *et al.* Prospective, randomized comparison of high-frequency oscillatory ventilation and conventional mechanical ventilation in pediatric respiratory failure. *Crit Care Med.* 1994; v. 22, n. 10, p. 1530-9.
- Ashbaugh DG, *et al.* Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967; v. 2, n. 7511, p. 319-23.
- Authors/Writing Committee and the Members of the ARDS Definition Task Force. Acute Respiratory Distress Syndrome. The Berlin Definition. *JAMA.* 2012; 307:2526-33.
- Authors/ Writing Committee and members of the subcommittee An Official American Thoracic Society Workshop Report: Features and Measurements of Experimental Acute Lung Injury in Animals. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; v. 44, p 725–738.
- Bae JW, Bae JS. Barrier protective effects of lycopene in human endothelial cells *Inflamm. Res.* 2011; 60:751–758.
- Ben Jaballah N, Khaldi A, Mnif K, *et al.* High-frequency oscillatory ventilation in pediatric patients with acute respiratory failure. *Pediatr Crit Care Med* 2006; 7:362-367.
- Beretta G, *et al.* Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem.* 2006; v. 354, n. 2, p. 290-8.
- Cao G, Prior RL. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol.* 1999; v. 299, n., p. 50-62.
- Carvalho MEP, *et al.* Fisiopatologia da lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório agudo - Bases Fisiopatológicas da Cirurgia. São Paulo: Lemar – Livraria e Editora Marina. 1999; v.51.

Caryl Goodyear-Bruch, Janet D. Pierce. Oxidative Stress in Critically Ill Patients Am J Crit Care 2002; 11 543-551.

Chan KP, Stewart TE. Clinical use of high-frequency oscillatory ventilation in adult patients with acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med. 2005; v. 33, n. 3 Suppl, p. S170-4.

Chow CW, *et al.* Oxidative stress and acute lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003; v. 29, n. 4, p. 427-31.

Ciencewicki J, *et al.* Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. J Allergy Clin Immunol. 2008; v. 122, n. 3, p. 456-68; quiz 469-70.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol Biotechnol. 2004, v. 26, n. 3, p. 249-61.

Collins AR, *et al.* Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. Carcinogenesis. 1998; v. 9, n. p. 2159-2162.

Cooke MS, *et al.* Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. Faseb J. 2003; v. 17, n. 10, p. 1195-214

Dahlem P, *et al.* Pediatric acute lung injury. Pediatr Respir Rev. 2007; v. 8, n. 4, p. 348-62.

Davies JD, *et al.* Should A Tidal Volume of 6 mL/kg Be Used in All Patients? Respir Care. 2016; 61:6, 774-90.

Del Giudice R, *et al.* Carotenoids in fresh and processed tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits protect cells from oxidative stress injury J Sci Food Agric. 2016; 97:1616–1623.

Derdak S, Mehta S, Stewart TE, *et al.* High-frequency oscillatory ventilation for acute respiratory distress syndrome in adults: A randomized controlled trial. Am J Resp Crit Care Med 2002; 166:801-808.

Dernaika TA, *et al.* Update on ARDS: beyond the low tidal volume. Am J Med Sci. 2009; v. 337, n. 5, p. 360-7.

Di Mascio P, *et al.* Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. Arch Biochem Biophys. 1989; v. 274, n. p. 532-538.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. Rev Assoc Med Bras. 1997; v. 43, n. 1, p. 61-8.

Ferreira ALA, *et al.* Tissue distribution of lycopene in ferrets and rats after lycopene supplementation. J Nutr. 2000; v. 130, n. 5, p. 1256-60.

Ferreira ALA, *et al.* Doxorubicin as an Antioxidant: Maintenance of Myocardial Levels of Lycopene under Doxorubicin Treatment. Free Radic Biol Med. 2007; v. 43, n. 5, p. 740-751.

Ferreira ALA, *et al.* Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. Mutat Res. 2007; v. 631, n., p. 26-35.

Fioretto JR, *et al.* Comparação entre ventilação mecânica convencional protetora e ventilação oscilatória de alta frequência associado à posição prona. Fioretto JR *et al.* Rev Bras Ter Intensiva. 2017;29:427-435

Fioretto JR., *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; v. 57, n. 2, p. 273-281.

Fioretto JR, *et al.* Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo em Crianças: Incidência, Mortalidade e Trocas Gasosas. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2001; v. 2, n., p. 58-62.

Fioretto JR, Rebello CM. Ventilação oscilatória de alta frequência em pediatria e neonatologia. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2009; 21:1, 96-103

Forchhammer L, *et al.* Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. *Mutagenesis*. 2010; v. 25, n. 2, p. 113-23.

Gattinoni L, *et al.* Body position changes redistribute lung computed-tomographic density in patients with acute respiratory failure: impact and clinical fallout through the following 20 years. *Intensive Care Med* 2013; 39:1909–1915.

Gattinoni, L, *et al.* Relationships between lung computed tomographic density, gas exchange, and PEEP in acute respiratory failure. *Anesthesiology*. 1988; v. 69, n. 6, p. 824-32.

Ghavipour M, *et al.* Tomato juice consumption reduces systemic inflammation in overweight and obese females. *Br J Nutr*. 2012; v. 109, n. 11, p. 2031-5.

Girard TD, Bernard GR. Mechanical ventilation in ARDS: a state-of-the-art review. *Chest*. 2007; v. 131, n. 3, p. 921-9.

Guérin C, *et al.* Prone Positioning in Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2013; 368;23.

Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull*. 1999; v. 55, n. 1, p. 49-75.

Hemmila, MR, Napolitano LM. Severe respiratory failure: Advanced treatment options. *Critical Care Medicine*, 2006. 34:9, s278-s290.

Hung CF, *et al.* Lycopene inhibits TNF-alpha-induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion. *Eur J Pharmacol*. 2008; v. 586, n. 1-3, p. 275-82.

Imai Y, *et al.* Comparison of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation. *J Appl Physiol*. 2001; v. 91, n. 4, p. 1836-44.

Jamshidzadeh A, *et al.* Effects of tomato extract on oxidative stress induced toxicity in different organs of rats. *Food Chem Toxicol*. 2008; v. 46, n. 12, p. 3612-5.

Jian MY, *et al.* Comparison of acid-induced inflammatory responses in the rat lung during high frequency oscillatory and conventional mechanical ventilation. *Inflamm Res*. 2010; v. 59, n. 11, p. 931-937.

Khachik F, *et al.* Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002; v. 227, n. 10, p. 845-51.

Kinkel SL, *et al.* Cytokine-induced mechanisms of acute lung injury leading to ARDS. New York: Cambridge University Press. 1999; v.63.

Kinniry P, *et al.* Dietary flaxseed supplementation ameliorates inflammation and oxidative tissue damage in experimental models of acute lung injury in mice. *J Nutr.* 2006; v. 136, n. 6, p. 1545-51.

Koekkoek WACK, van Zanten ARH. Antioxidant Vitamins and Trace Elements in Critical Illness. American Society for Parenteral and Enteral Nutrition Nutrition in Clinical Practice. Volume XX Number X Month 201X 1 –18 © 2016. (in press)

Kumaravel TS, *et al.* Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol.* 2009; v. 25, n. 1, p. 53-64.

Lamb NJ, *et al.* 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; v. 27, n. 9, p. 1738-44.

Lee WL, Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury. *Curr Opin Crit Care.* 2001; v. 7, n. 1, p. 1-7.

Lia Graciano A, Freid EB. High-frequency oscillatory ventilation in infants and children. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2002; v. 15, n. 2, p. 161-6.

Lu Y, *et al.* A new carotenoid, hydrogen peroxide oxidation products from lycopene. *Biosci Biotech Biochem.* 1995; v. 59, n., p. 2153-2155.

Luvizotto RD, *et al.* Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. *Br J Nutr.* 2013; v., n., p. 1-7.

Mangels AR., *et al.* Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *J Am Diet Assoc.* 1993; v. 93, n. 3, p. 284-96.

Marini JJ, *et al.* Should Early Prone Positioning Be a Standard of Care in ARDS With Refractory Hypoxemia? *Respir Care.* 2016; 61:6, 818-29.

Metnitz, PG, *et al.* Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 1999; v. 25, n. 2, p. 180-5.

Meyer J, *et al.* Protective strategies of high-frequency oscillatory ventilation in a rabbit model. *Pediatr Res.* 2006; v. 60, n. 4, p. 401-6.

Minorsky PV. Lycopene and human health. *Plant Physiol.* 2002; v. 130, n. 3, p. 1077-8.

Mireles-Cabodevila E, Kacmarek RM. Should Airway Pressure Release Ventilation Be the Primary Mode in ARDS? *Respir Care.* 2016; 61:6, 761-73.

Moller P, *et al.* Assessment and reduction of comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group. *Mutagenesis.* 2010; v. 25, n. 2, p. 109-11.

Okamoto K, *et al.* Efficacy of inhaled nitric oxide in children with ARDS. *Chest.* 1998; v. 114, n. 3, p. 827-33.

Quinlan GJ, *et al.* Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res.* 1994; v. 20, n. 5, p. 289-98.

Ranieri, VM., *et al.* Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *Jama*. 2000; v. 284, n. 1, p. 43-4.

Rao AV, Agarwal S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J Am Coll Nutr*. 2000; v. 19, n. 5, p. 563-9.

Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*. 2007; 55 207–216.

Ritter C, *et al.* Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat. *Crit Care Med*. 2006; v. 34, n. 2, p. 471-7.

Rocksén D, *et al.* Vitamin E reduces transendothelial migration of neutrophils and prevents lung injury in endotoxin-induced airway inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2003; v. 28, n., p. 199–207.

Ronchi CF, *et al.* High-frequency oscillatory ventilation attenuates oxidative lung injury in a rabbit model of acute lung injury. *Exp Biol Med*. 2011; v. 236, n., p. 1188–1196.

Ronchi CF, *et al.* Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury induced in rabbits submitted to different strategies of mechanical ventilation. *J Appl Physiol*. 2012; v. 112, n. 7, p. 1184-90.

Ronchi CF, *et al.* Interactive effects of mechanical ventilation, inhaled nitric oxide and oxidative stress in acute lung injury. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2014; v.190, p.118–123.

Rotta AT, *et al.* Comparison of lung protective ventilation strategies in a rabbit model of acute lung injury. *Crit Care Med*. 2001; v. 29, n. 11, p. 2176-84.

Samet JM, *et al.* Effect of antioxidant supplementation on ozone induced lung injury in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164:819-825.

Sato K, *et al.* In vivo lipid-derived free radical formation by NADPH oxidase in acute lung injury induced by lipopolysaccharide: a model for ARDS. *Faseb J*. 2002; v. 16, n. 13, p. 1713-20.

Schmidt R, *et al.* Alveolar antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J*. 2004; v. 24, n. 6, p. 994-9.

Sessler CN. Mechanical ventilation of patients with acute lung injury. *Crit Care Clin*. 1998; v. 14, n. 4, p. 707-29.

Sibbald WJ, *et al.* Biventricular function in the adult respiratory distress syndrome. *Chest*. 1983; v. 84, n. 2, p. 126-34.

Siler TM, *et al.* Immunoreactive interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of high-risk patients and patients with the adult respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res*. 1989; v. 15, n. 6, p. 881-94.

Singh NP, *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; v. 175, n. 1, p. 184-91.

Slutsky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest*. 1999; v. 116, n. 1 Suppl, p. 9S-15S.

Soltan-Sharifi MS, *et al*. Improvement by N-acetylcysteine of acute respiratory distress syndrome through increasing intracellular glutathione, and extracellular thiol molecules and anti-oxidant power: evidence for underlying toxicological mechanisms. *Hum Exp Toxicol*. 2007; v. 26, n. 9, p. 697-703.

Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*. 2003; v. 24, n. 6, p. 345-51.

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; v. 342, n. 18, p. 1301-8.

Tice RR., *et al*. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000; v. 35, n. 3, p. 206-21.

Tice RR, *et al*. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol*. 1991; 283:157-64.

Touyz RM, Schiffrin E L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol*. 2004; v. 122, n. 4, p. 339-52.

Turner DA, Arnold JH. Insights in pediatric ventilation: timing of intubation, ventilatory strategies, and weaning. *Curr Opin Crit Care*. 2007; v. 13, n. 1, p. 57-63.

Viana ME, *et al*. The impact of mechanical ventilation strategies that minimize atelectrauma in an experimental model of acute lung injury. *J Pediatr (Rio J)*. 2004; v. 80, n. 3, p. 189-96.

Wang S, *et al*. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H₂O₂ and p53-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2004; v. 279, n. 24, p. 25535-43.

Ware LB. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006; v. 27, n. 4, p. 337-49.

Wayner DD, *et al*. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letters*. 1985; v. 187, n., p. 33-37.

Anexos

CONTROLE DURANTE A INDUÇÃO DE SDRA

Grupo de estudo:

Data:

Animal nº:

Peso:

Volume Infundido:

Hora							
Nº lavagens	Pré-indução	5ª lav.	8ª lav.				
VC (ml/kg)							
MAP							
P insp.							
Peep	5	5	5	5	5	5	5
FR							
FC							
PAM							
PaO ₂							
PaO ₂ /FiO ₂							
PaCO ₂							
BE							
IO							
Bic							
Compl. Estática							
pH							
Saturação							
Temperatura							
Pancurônio							

Hora									
Tempo (minutos)	0	30	60	90	120	150	180	210	240
PEEP	5	8	8	10	10	10	10	10	10
PIP									
VC_{insp}									
MAP									
FR									
FC									
PAM									
pH									
PaCO₂									
PaO₂									
PaO₂/FiO₂									
IO									
Complacência Pausa Ins Manual									
Saturação									
Temperatura									
Pancurônio									
Peso do pulmão direito (g)									

$$IO = [(FiO_2 \times MAP) / PaO_2] \times 100$$

UNESP

FACULDADE DE MEDICINA
FMB
BOTUCATU

CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1107/2014-CEUA

CERTIFICAMOS que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEUA 1107/2014) Efeito da suplementação com licopeno sobre o estresse oxidativo pulmonar induzido por lesão pulmonar aguda experimental, a ser conduzido por Susiane de Oliveira Kiefens, orientada pelo Prof. Dr. José Roberto Fioretto, co-orientado por Carlos Fernando Ronchi, com a colaboração de Climerly Suemil Kurokawa, Marcos Aurélio de Moraes e Mario Ferreira Carpi, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "coelhos" são provenientes de Biotério Convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

CERTIFICAMOS, ainda que foi autorizada a utilização de "50 coelhos". Caso seja necessária a utilização de mais animais deverá ser comunicado a esta CEUA.

Prof. Adjunto Katashi Okoshi
Presidente da CEUA

Kleber Messias de Camargo
Secretário da CEUA

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 30/10/2014

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br



Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

unesp

CERTIFICADO - RETIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da suplementação com licopeno sobre o estresse oxidativo pulmonar induzido por lesão pulmonar aguda experimental.", conduzida pela Pesquisadora: **Susiane de Oliveira Kiefens Barbosa**, Orientada pelo Prof. Titular José Roberto Fioretto, Coorientada pelo Prof. Dr. Carlos Fernando Ronchi, com a participação dos Colaboradores: Profa. Dra. Cilmary Suemi Kurakawa, Prof. Dr. Marcos Aurélio de Moraes e Prof. Dr. Mario Ferreira Carpi, registrada com o nº 1107/2014, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Alteração do número de coelhos utilizados de 50 para 55, APROVADA em 18 de janeiro de 2018.

Finalidade	() Ensino - (X) Pesquisa Científica
Espécie/Linhagem/Raça	Coelho/New Zealand
Nº de animais	55
Sexo	Macho
Idade/Peso	Jovens/1,5-3 Kg
Origem	Biotério Central da UNESP – FMB

Graziela Nogueira Bertani
Graziela Nogueira Bertani
Secretária Responsável
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº – Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 / Fone: (14) 3880.1608 / E-mail Secretária: ceua@fmb.unesp.br