

Ventilação mecânica com baixo volume corrente e estresse oxidativo em pulmões saudáveis de camundongos*

Low tidal volume mechanical ventilation and oxidative stress in healthy mouse lungs

Karla Maria Pereira Pires, Adriana Correa Melo, Manuella Lanzetti,
Natália Vasconcelos Casquilho, Walter Araújo Zin,
Luís Cristóvão Porto, Samuel Santos Valença

Resumo

Objetivo: A ventilação mecânica (VM) por si própria pode contribuir diretamente para a lesão pulmonar. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar biomarcadores precoces relacionados ao equilíbrio oxidantes/antioxidantes, estresse oxidativo e inflamação causados por VM de curta duração em pulmões de camundongos saudáveis. **Métodos:** Vinte camundongos C57BL/6 machos foram randomicamente divididos em dois grupos: VM, submetidos a VM com baixo volume corrente (V_T , 6 mL/kg) por 30 min; e respiração espontânea (RE), utilizados como controles. Amostras de homogeneizados de pulmão foram testados quanto à atividade de enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica e expressão de TNF- α . **Resultados:** Comparados ao grupo RE, houve uma redução significativa na atividade de superóxido dismutase ($\approx 35\%$; $p < 0,05$) e aumento da atividade de catalase (40%; $p < 0,01$), glutatona peroxidase (500%; $p < 0,001$) e mieloperoxidase (260%; $p < 0,001$), ao passo que a razão glutatona reduzida/glutatona oxidada foi menor ($\approx 50\%$; $p < 0,05$), e houve um aumento na atividade de expressão de TNF- α no grupo VM. O dano oxidativo, analisado como peroxidação lipídica, também aumentou no grupo VM (45%; $p < 0,05$). **Conclusões:** Nossos resultados demonstraram que VM de curta duração com baixa V_T pode contribuir diretamente para a lesão pulmonar, gerando estresse oxidativo e inflamação em pulmões de camundongos saudáveis.

Descritores: Lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica; Respiração artificial; Estresse oxidativo; Inflamação; Camundongos.

Abstract

Objective: Mechanical ventilation (MV) itself can directly contribute to lung injury. Therefore, the aim of the present study was to investigate early biomarkers concerning oxidant/antioxidant balance, oxidative stress, and inflammation caused by short-term MV in healthy mouse lungs. **Methods:** Twenty male C57BL/6 mice were randomly divided into two groups: MV, submitted to low tidal volume (V_T , 6 mL/kg) MV for 30 min; and spontaneous respiration (SR), used as controls. Lung homogenate samples were tested regarding the activity of various antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and TNF- α expression. **Results:** In comparison with the SR group, the MV group showed a significant decrease in the activity of superoxide dismutase ($\approx 35\%$; $p < 0.05$), together with an increase in the activity of catalase (40%; $p < 0.01$), glutathione peroxidase (500%; $p < 0.001$), and myeloperoxidase (260%; $p < 0.001$), as well as a reduction in the glutathione/oxidized glutathione ratio ($\approx 50\%$; $p < 0.05$) and an increase in TNF- α expression in the MV group. Oxidative damage, assessed by lipid peroxidation, was also greater in the MV group (45%; $p < 0.05$). **Conclusions:** Our results show that short-term low V_T MV can directly contribute to lung injury, generating oxidative stress and inflammation in healthy mouse lungs.

Keywords: Ventilator-induced lung injury; Respiration, artificial; Oxidative stress; Inflammation; Mice.

* Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro; Laboratório de Fisiologia da Respiração, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro; e Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Endereço para correspondência: Samuel Santos Valença. LABCOM/ICB/CCS/UFRJ. Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Bloco F, Sala 14, Ilha do Fundão, CEP 21.941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Tel. 55 21 2562-6460. Fax: 55 21 2562-6734. E-mail: samuelv@ufrj.br

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Recebido para publicação em 24/5/2011. Aprovado, após revisão, em 1/12/2011.

Introdução

O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, favorecendo os oxidantes. Os pulmões têm um sistema antioxidante bem desenvolvido a fim de se proteger contra a exposição a oxidantes, que pode levar a maior oxidação de proteínas, DNA e lipídios.⁽¹⁾ Enzimas antioxidantes essenciais, tais como catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, oferecem proteção contra o dano induzido por superóxido e peróxido de hidrogênio. A participação do estresse oxidativo em doenças pulmonares, tais como DPOC, lesão pulmonar aguda e asma, tem sido muito citada na literatura científica.⁽²⁻⁴⁾

Demonstrou-se recentemente que protocolos de ventilação mecânica (VM) estendida – isto é, com volume corrente (V_T) elevado – têm efeitos pró-inflamatórios e oxidativos e podem comprometer a função pulmonar, principalmente por meio de estresse mecânico sobre o tecido pulmonar.^(5,6) Por isso, um V_T mais fisiológico (4-6 mL/kg, conforme sugerido pela *ARDS Network*) também tem sido usado, porém não foi capaz de reduzir a resposta inflamatória em pulmões saudáveis.⁽⁷⁾

Os biomarcadores subjacentes ao estresse oxidativo com V_T fisiológico ainda não estão claros. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar biomarcadores precoces relacionados ao equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, ao estresse oxidativo e à inflamação causados por VM de curta duração em pulmões saudáveis de camundongos.

Métodos

Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com a lei brasileira de experimentação animal (Lei Arouca, no. 11.794, 8 de outubro de 2008) e foram aprovados pelo Comitê de Tratamento e Uso de Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, no Rio de Janeiro (RJ). Compramos vinte camundongos C57BL/6 machos (8 semanas de idade; peso = 20-24 g) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, em Niterói (RJ). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, com 10 animais cada: grupo VM e grupo respiração espontânea (RE).

Os animais foram sedados com diazepam (1 mg/kg i.p.), anestesiados com pentobarbital (20 mg/kg i.p.) e submetidos a intubação traqueal. Os

animais do grupo VM foram então submetidos a VM com um ventilador de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideu, Uruguai). Os animais do grupo RE foram submetidos a procedimento simulado (sedação, anestesia e intubação traqueal, porém sem VM). Conforme o protocolo, o V_T foi ajustado para 6 mL/kg, com fluxo respiratório de 1 mL/s, FiO_2 de 0,21 (com gás seco), FR de 100 ciclos/min e pressão expiratória final positiva de 3 cmH₂O.⁽⁸⁾ Os camundongos foram ventilados com ar ambiente. Após 30 min de VM ou RE, os camundongos foram imediatamente sacrificados.

Os espaços aéreos foram lavados com solução salina tamponada (500 µL) três vezes consecutivas (volume final = 1,2-1,5 mL). O fluido foi retirado e armazenado em gelo. Determinou-se o total de células mononucleares e polimorfonucleares por meio de um contador (Zi Coulter; Beckman Coulter, Carlsbad, CA, EUA). Contagens diferenciais de células foram realizadas em preparações de citocentrífuga (Shandon, Waltham, MA, EUA) coradas com Diff-Quik (Baxter Dade, Dudingem, Suíça). Pelo menos 200 células por amostra de LBA foram contadas utilizando critérios morfológicos convencionais.

O ventrículo direito foi submetido a perfusão com soro fisiológico a fim de remover o sangue. Os pulmões foram removidos e então homogeneizados em gelo com PBS (pH = 7,3) a 10% (p/v) por meio de um homogeneizador Ultra-Turrax T8 (IKA, Toronto, Ontário, Canadá). Em seguida, os pulmões foram centrifugados a 3.000 g durante 5 min. Os sobrenadantes foram mantidos a 20 °C para análise de proteínas. O conteúdo proteico total das amostras de LBA e de homogeneizados de pulmão foi determinado por meio do método de Bradford.

A fim de avaliar se a VM resultou em desequilíbrio redox, as enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG) foram analisadas espectrofotometricamente nos homogeneizados de pulmão. A atividade da catalase foi medida pela taxa de diminuição da concentração de H₂O₂ a 240 nm.⁽⁹⁾ A atividade da enzima superóxido dismutase foi medida pela inibição da auto-oxidação da adrenalina com absorbância a 480 nm.⁽¹⁰⁾ A atividade da glutathione peroxidase foi medida por meio do monitoramento da oxidação de NADPH a 340 nm na presença de H₂O₂.⁽¹¹⁾ Os homogeneizados de pulmão foram

acidificados com ácido 5-sulfossilicólico a 5% (1:1) para a análise de GSH e GSSG.⁽¹²⁾

A concentração de malondialdeído foi medida por meio da quantificação de *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).⁽¹³⁾ Amostras de homogeneizados de órgão (400 µL) foram desproteinizadas com 800 µL de ácido tricloroacético a 10% e centrifugadas a 900 g durante 10 min. Depois disso, 1.000 µL de sobrenadantes foram misturados a 1.000 µL de TBARS a 0,67%. A mistura foi aquecida durante 60 min em água fervente e então resfriada. A absorbância da fase orgânica contendo o cromógeno rosa foi medida espectrofotometricamente a 532 nm. O método foi padronizado com concentrações crescentes de malondialdeído. Os equivalentes do malondialdeído foram expressos em nmol/mg de proteína.

A atividade da mieloperoxidase foi medida por meio do uso de H₂O₂, brometo de hexadeciltrimetilamônio (BHTA) e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).⁽¹⁴⁾ Inicialmente, 100 µL de amostras de homogeneizados de órgão foram centrifugados com 900 µL de BHTA a 14.000 g durante 15 min. Depois disso, 75 µL do sobrenadante foram incubados com 5 µL de TMB durante 5 min a 37 °C. A mistura foi então incubada com 50 µL de H₂O₂ a 37 °C durante 10 min, após os quais foram adicionados 125 µL de solução tampão de acetato de sódio. A reação foi lida em um espectrofluorímetro de multiplacas (modelo 550; Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) a 630 nm. O método foi padronizado com concentrações crescentes de mieloperoxidase. A atividade da mieloperoxidase foi expressa em mU/mg de proteína.

Proteínas de homogeneizados de tecido foram separadas por PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (100 V durante 3 h a 4 °C). As membranas foram então lavadas e bloqueadas em PBS-Tween contendo leite desnatado a 5% e Tween a 0,05% durante 2 h e posteriormente incubadas para detecção de TNF-α por meio de anticorpo primário específico de cabra anticamundongo (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). As membranas foram então incubadas com conjugado de HRP-anticorpo (1:2.000) direcionado contra o anticorpo primário durante 2 h. As membranas foram então tratadas com agentes quimioluminescentes (luminol e *enhancer*; ECL Plus; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA)

e expostas a filme fotossensível. A coloração de Ponceau foi realizada como controle de carga.

A normalidade de todos os dados foi testada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram expressos em médias ± ep da média. Os dados paramétricos foram comparados por meio do teste t de Student não pareado. Os dados não paramétricos foram comparados por meio do teste de Wilcoxon. Valores de p < 0,05 foram considerados significantes.

Resultados

Primeiro testamos se a VM durante 30 min seria capaz de iniciar uma resposta inflamatória em pulmões de camundongos. Houve um aumento significativo da expressão de TNF-α nos homogeneizados de pulmão após 30 min de VM (Figura 1). Além disso, medimos a atividade da mieloperoxidase, que é o resultado de ativação de neutrófilos (Tabela 1). Houve um aumento de quatro vezes na atividade da mieloperoxidase no grupo VM em comparação com o grupo RE (p < 0,001).

Após 30 min de VM, houve um aumento de uma vez na concentração total de proteínas (grupo RE: 0,06 ± 0,01 g/dL e grupo VM: 0,117 ± 0,010 g/dL; p < 0,01) no lavado broncoalveolar; entretanto, não houve alterações nos homogeneizados de tecido (grupo RE: 0,23 ± 0,05 g/dL e grupo VM: 0,22 ± 0,05 g/dL; p > 0,05). Posteriormente, medimos a atividade antioxidante a fim de determinar se a VM poderia causar desequilíbrio

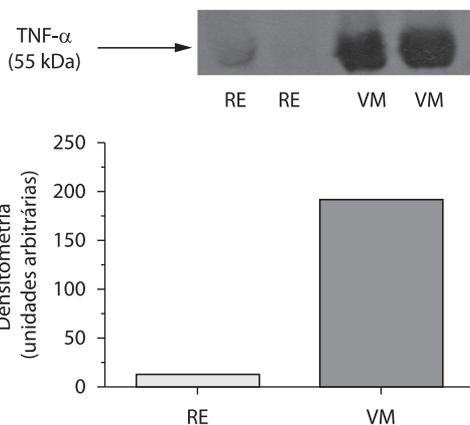


Figura 1 – Expressão de TNF-α nos grupos respiração espontânea (RE) e ventilação mecânica (VM). O grupo VM apresentou aumento da expressão de TNF-α em comparação com o grupo RE. A coloração de Ponceau foi usada como controle de carga.

Tabela 1 – Análises bioquímicas em homogeneizados de pulmão nos grupos estudados.^a

Variável	Grupo		p*
	RE	VM	
SOD, U/mg de proteína	316,5 ± 25,14	209,06 ± 7,49	< 0,05
CAT, U/mg de proteína	5,16 ± 0,42	7,15 ± 0,35	< 0,01
GPx, mM/mg de proteína	2,72 ± 0,17	12,74 ± 1,18	< 0,001
Relação GSH/GSSG	2,08 ± 0,12	1,03 ± 0,54	< 0,05
MDA, nmol/mg de proteína	0,75 ± 0,04	1,10 ± 0,12	< 0,05
MPO, mU/mg de proteína	5,74 ± 0,57	20,70 ± 1,62	< 0,001

RE: respiração espontânea; VM: ventilação mecânica; SOD: atividade da enzima superóxido dismutase; CAT: atividade da catalase; GPx: atividade da glutatona peroxidase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; MDA: malondialdeído; e MPO: atividade da mieloperoxidase. ^aValores expressos em médias ± ep da média. *Teste t de Student.

de oxirredução no tecido pulmonar (Tabela 1). Houve redução da atividade da enzima superóxido dismutase ($p < 0,05$) e aumento da atividade da catalase no grupo VM ($p < 0,01$) em comparação com o grupo RE. Houve um aumento de cinco vezes na atividade da glutatona peroxidase ($p < 0,001$) em comparação com o grupo RE, bem como uma diminuição de 50% da relação GSH/GSSG no grupo VM ($p < 0,05$).

Confirmamos que a VM causou dano oxidativo em pulmões saudáveis (Tabela 1). Em comparação com o grupo RE, houve um aumento de 45% nos níveis de malondialdeído no grupo VM 30 min após a aplicação do protocolo de VM.

Discussão

Demonstramos que 30 min de VM com um V_T de 6,0 mL/kg causaram liberação de TNF- α , peroxidação lipídica e estresse oxidativo em pulmões saudáveis de camundongos. Até onde sabemos, trata-se do primeiro estudo a descrever os marcadores inflamatórios precoces e os marcadores de desequilíbrio redox com o uso de um V_T mais fisiológico em pulmões saudáveis de camundongos.

Foram descritos na literatura os efeitos danosos da VM causados por forças mecânicas. Estudos demonstraram que células endoteliais cisalhadas produzem mediadores inflamatórios, incluindo a liberação de TNF- α mediado por fator nuclear kappa B,⁽¹⁵⁾ e que mecanismos de mecanotransdução, nos quais o citoesqueleto transmite tensões diretamente a organelas internas, estão envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e na sinalização de proteínas de adesão, tais como a P-selectina.^(16,17) Embora seja ainda necessário elucidar os mecanismos subjacentes à mecanotransdução que induz a produção de ERO nos pulmões, relatou-se

que há relação entre o aumento da atividade mitocondrial da NADPH oxidase e a produção de ERO em células endoteliais em resposta a estiramento mecânico, sinalizando a ativação de respostas inflamatórias.⁽¹⁸⁾

Sabe-se muito bem que o TNF- α é uma citocina inflamatória precoce que posteriormente regula tanto a infiltração precoce de neutrófilos como o recrutamento de eosinófilos para o pulmão e espaço aéreo, produzido por outras células inflamatórias, tais como macrófagos, ou por meio de mecanismos de mecanotransdução.⁽¹⁹⁾ Em estudos prévios, relatou-se que os níveis de TNF- α não se modificaram após 2 h de VM.⁽²⁰⁾ Diante do fato de que a expressão de TNF- α aumentou significativamente nos homogeneizados de pulmão do grupo VM, acreditamos que a VM de curta duração com V_T baixo foi capaz de iniciar a resposta inflamatória nos pulmões de camundongos. O elevado conteúdo proteico do lavado broncoalveolar e o aumento da atividade da mieloperoxidase⁽²¹⁾ podem dar respaldo a essa afirmação a respeito do grupo VM. Acreditamos que o uso de uma variedade distinta de camundongo pode ser responsável por essas diferenças, já que demonstramos, em um estudo prévio, que camundongos C57BL/6 são mais suscetíveis a dano oxidativo que camundongos suíços.⁽⁴⁾

Relatou-se anteriormente que a VM é um modulador de estresse oxidativo não só nos pulmões,⁽²²⁾ mas também em outros órgãos,⁽²³⁾ e que o *nuclear factor (erythroid-derived-2)-related factor-2* (NRF-2), um fator de transcrição ativado por sinal para enzimas antioxidantes, desempenha um papel crítico no estresse oxidativo.⁽²⁴⁾ No presente estudo, acreditamos que dois processos principais participaram da lesão pulmonar causada por VM: estresse oxidativo e inflamação. Sabe-se que a VM aumenta tanto o recrutamento de neutrófilos como a atividade da mieloperoxidase

em animais e humanos.⁽²⁵⁾ A mieloperoxidase é liberada principalmente por neutrófilos ativados, o que também se caracteriza por propriedades pró-oxidativas e pró-inflamatórias poderosas. Além disso, a mieloperoxidase catalisa a produção de oxidantes potentes, tais como o ácido hipocloroso, e das espécies nitrantes (dióxido de nitrogênio a partir de nitrito).⁽²⁶⁾ Portanto, é mais provável que ocorra dano oxidativo em um ambiente em que se constate elevada atividade de mieloperoxidase.

A associação entre oxidação lipídica nos pulmões e VM foi relatada previamente.⁽²⁷⁾ No presente estudo, a quantidade de aldeídos derivados de peroxidação aumentou nos homogeneizados de pulmão 30 min após a VM. Devido a sua estabilidade, os aldeídos derivados de peroxidação lipídica podem ser difundidos na célula ou mesmo escapar dela e atacar alvos distantes do local do evento original de radical livre.

Já que relatamos que não houve alterações histológicas na barreira alveolocapilar em modelos de VM com V_T baixo (dados não apresentados), sugerimos que tanto o recrutamento de células alveolares induzido por estresse mecânico como níveis reduzidos de oxigenação tecidual podem ter desempenhado papéis importantes no processo de estresse oxidativo precoce em nosso modelo. No que tange a mecanismos pró-oxidantes, demonstrou-se que em condições de hipóxia e estresse por cisalhamento, as células pulmonares respondem a estímulos danosos produzindo ERO, tais como superóxido (O_2^-), por meio de NADPH ou de aumentos de xantina oxidase, levando à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) se óxido nítrico estiver presente no ambiente, principalmente em componentes da barreira alveolocapilar.⁽²⁸⁾

Verificamos uma diminuição significativa da atividade da enzima superóxido dismutase no grupo VM. É possível que a redução da atividade da enzima superóxido dismutase se deva, em parte, à perda de atividade enzimática específica, conforme observado pela ação de oxidantes. Portanto, sugerimos que uma redução da atividade da enzima superóxido dismutase possa ter um efeito direto sobre a superprodução de O_2^- nos pulmões. Entretanto, é possível que O_2^- tenha sido primeiro convertido em $ONOO^-$, já que a constante de conversão é mais de 3,5 vezes mais rápida que a da dismutação de O_2^- por superóxido dismutase.⁽²⁹⁾ Além disso, no presente estudo, o aumento da produção de H_2O_2 pode ter servido principalmente de substrato para a mieloperoxidase

em vez de ser totalmente inativada pela catalase, conforme indicado pela redução da atividade da catalase no grupo VM. Ademais, nossos dados indicam uma possível ação de ERO induzindo peroxidação lipídica, o que pode ter resultado em aumento dos níveis de malondialdeído no grupo VM. A fim de contrabalançar a ação oxidativa de lipídios reativos, a atividade da glutatona peroxidase também aumenta e, por sua vez, a relação GSH/GSSG diminui.

A VM de curta duração com V_T baixo induziu não apenas inflamação, mas também desequilíbrio redox e dano oxidativo em pulmões saudáveis de camundongos. Nosso modelo possibilita o estudo dos biomarcadores precoces de resposta oxidativa que se encontram subjacentes à VM; entretanto, o modelo apresenta limitações. Não se pode descartar o fato de que a situação de estresse oxidativo possa ser transitória nesse modelo e, portanto, não necessariamente resultar em alterações na histoarquitetura nos pulmões de camundongos. Além disso, é possível que o mecanismo de reparo e os antioxidantes sejam ativados simultaneamente para contrabalancear o aumento intenso de mieloperoxidase e $TNF-\alpha$ a fim de atingir um novo equilíbrio redox antes que uma alteração da função/morfologia “normal” possa ser detectada. O status pró-inflamatório foi analisado apenas como expressão de $TNF-\alpha$. As outras citocinas e reguladores de inflamação, tais como o fator nuclear kappa B e *activator protein 1*, devem ser considerados em estudos futuros. Além disso, o NRF-2, responsável pela liberação de enzimas antioxidantes e pela regulação do desequilíbrio redox, deve ser mais bem estudado. No que tange a parâmetros de VM, já que no presente estudo não se utilizou ar umidificado e tampouco foram medidas a PaO_2 e a pressão arterial, é possível que alguns dos parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo analisados tenham sido o resultado de hipóxia relacionada à eficiência da VM. Entretanto, vários autores especularam que o atelectrauma pode desempenhar um papel na lesão pulmonar induzida por VM devido ao baixo V_T , já que partes do pulmão podem passar por vários períodos hipoxêmicos durante a VM.⁽³⁰⁾ Portanto, o baixo V_T pode ter resultado em volumes inadequados de ventilação, causando hipóxia tecidual. Com um V_T baixo, é possível que a troca gasosa seja impedida pela ventilação do espaço morto. É possível que volumes pequenos não levem a troca adequada

de ar nos alvéolos se estes estiverem próximos ao espaço morto. Embora não possamos descartar a possibilidade de que o baixo V_T tenha levado a hipóxia, devido principalmente à ventilação do espaço morto, não acreditamos que este tenha sido o principal motivo do estresse oxidativo e da inflamação. Outros problemas relacionados à hipóxia incluem baixa FiO_2 e o uso de ar não umidificado. Juntas, essas limitações não invalidam nosso estudo; ao contrário, abrem o campo de estudo do estresse oxidativo e da inflamação durante a VM em pulmões de camundongos.

Não podemos afirmar que nosso modelo de lesão pulmonar induzida por VM tenha efeito direto sobre o estresse oxidativo/inflamação. É possível que a VM induza um processo de estresse mecânico, que é seguido de estresse oxidativo e inflamação. Isso deve ser investigado em estudos futuros. Entretanto, os profissionais da área de saúde devem estar cientes do fato de que a ventilação protetora precoce utilizada como abordagem terapêutica pode também causar estresse oxidativo precoce. Além disso, a modulação da resposta inflamatória precoce e da resposta oxidativa precoce pode oferecer estratégias para reduzir a lesão pulmonar induzida por VM.

Referências

- Andrade Jr DR, Souza RB, Santos SA, Andrade DR. Oxygen free radicals and pulmonary disease. *J Bras Pneumol.* 2005;31(1):60-8.
- Park CS, Kim TB, Lee KY, Moon KA, Bae YJ, Jang MK, et al. Increased oxidative stress in the airway and development of allergic inflammation in a mouse model of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2009;103(3):238-47.
- Syrkina O, Jafari B, Hales CA, Quinn DA. Oxidant stress mediates inflammation and apoptosis in ventilator-induced lung injury. *Respirology.* 2008;13(3):333-40.
- Rueff-Barroso CR, Trajano ET, Alves JN, Paiva RO, Lanzetti M, Pires KM, et al. Organ-related cigarette smoke-induced oxidative stress is strain-dependent. *Med Sci Monit.* 2010;16(7):BR218-26.
- Wilson MR, Choudhury S, Goddard ME, O'Dea KP, Nicholson AG, Takata M. High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol.* 2003;95(4):1385-93.
- Taniguchi LU, Caldini EG, Velasco IT, Negri EM. Cytoskeleton and mechanotransduction in the pathophysiology of ventilator-induced lung injury. *J Bras Pneumol.* 2010;36(3):363-71.
- Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, Roelofs JJ, Juffermans NP, Schultz MJ. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care.* 2009;13(1):R1.
- Pires KM, Bezerra FS, Machado MN, Zin WA, Porto LC, Valença SS. N-(2-mercaptopropionyl)-glycine but not allopurinol prevented cigarette smoke-induced alveolar enlargement in mouse. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011;175(3):322-30.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279-312.
- Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-21.
- Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2006;1(6):3159-65.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.
- Krueger AJ, Yang JJ, Roy TA, Robbins DJ, Mackerer CR. An automated myeloperoxidase assay. *Clin Chem.* 1990;36(1):158.
- Rich PB, Douillet CD, Hurd H, Boucher RC. Effect of ventilatory rate on airway cytokine levels and lung injury. *J Surg Res.* 2003;113(1):139-45.
- Ichimura H, Parthasarathi K, Quadri S, Issekutz AC, Bhattacharya J. Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries. *J Clin Invest.* 2003;111(5):691-9.
- Hsieh HJ, Cheng CC, Wu ST, Chiu JJ, Wung BS, Wang DL. Increase of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression. *J Cell Physiol.* 1998;175(2):156-62.
- De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res.* 1998;82(10):1094-101.
- Bhattacharya S, Sen N, Yiming MT, Patel R, Parthasarathi K, Quadri S, et al. High tidal volume ventilation induces proinflammatory signaling in rat lung endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(2):218-24.
- Pedreira PR, Garcia-Prieto E, Parra D, Astudillo A, Diaz E, Taboada F, et al. Effects of melatonin in an experimental model of ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295(5):L820-7.
- Brégeon F, Roch A, Delpierre S, Ghigo E, Autillo-Touati A, Kajikawa O, et al. Conventional mechanical ventilation of healthy lungs induced pro-inflammatory cytokine gene transcription. *Respir Physiol Neurobiol.* 2002;132(2):191-203.
- Whidden MA, McClung JM, Falk DJ, Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, et al. Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *J Appl Physiol.* 2009;106(2):385-94.
- Douillet CD, Robinson WP 3rd, Zarzaur BL, Lazarowski ER, Boucher RC, Rich PB. Mechanical ventilation alters airway nucleotides and purinoceptors in lung and extrapulmonary organs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(1):52-8.
- Papaiahgari S, Yerrapureddy A, Reddy SR, Reddy NM, Dodd-O JM, Crow MT, et al. Genetic and pharmacologic evidence links oxidative stress to ventilator-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(12):1222-35.

25. Erdbrügger U, Hellmark T, Bunch DO, Alcorta DA, Jennette JC, Falk RJ, et al. Mapping of myeloperoxidase epitopes recognized by MPO-ANCA using human-mouse MPO chimeras. *Kidney Int.* 2006;69(10):1799-805.
26. Kumar AP, Ryan C, Cordy V, Reynolds WF. Inducible nitric oxide synthase expression is inhibited by myeloperoxidase. *Nitric Oxide.* 2005;13(1):42-53.
27. Ben Baouali A, Aube H, Maupoil V, Blettery B, Rochette L. Plasma lipid peroxidation in critically ill patients: importance of mechanical ventilation. *Free Radic Biol Med.* 1994;16(2):223-7.
28. Singh JM, Stewart TE. High-frequency mechanical ventilation principles and practices in the era of lung-protective ventilation strategies. *Respir Care Clin N Am.* 2002;8(2):247-60.
29. Hauber HP, Karp D, Goldmann T, Vollmer E, Zabel P. Effect of low tidal volume ventilation on lung function and inflammation in mice. *BMC Pulm Med.* 2010;10:21.
30. Nerlich S. Critical care management of the patient with acute respiratory distress syndrome (ARDS). Part 1: Pathophysiology and implications for mechanical ventilation. *Aust Crit Care.* 1997;10(2):49-54.

Sobre os autores

Karla Maria Pereira Pires

Professora Visitante. Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Adriana Correa Melo

Mestranda. Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Manuella Lanzetti

Doutoranda. Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Natália Vasconcelos Casquilho

Doutoranda. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Walter Araújo Zin

Professor Titular. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Luís Cristóvão Porto

Professor Titular. Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Samuel Santos Valença

Professor Adjunto. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.