

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE

JULIANA DIAS NASCIMENTO FERREIRA

**EFEITOS DA HIPERVENTILAÇÃO ESPONTÂNEA NA LESÃO
PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR INJEÇÃO
INTRAPERITONEAL DE LIPOPOLISSACÁRIDE EM RATOS
WISTAR**

Juiz de Fora

2023

**EFEITOS DA HIPERVENTILAÇÃO ESPONTÂNEA NA LESÃO
PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR INJEÇÃO
INTRAPERITONEAL DE LIPOPOLISSACÁRIDE EM RATOS
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde — área de
concentração em Saúde Brasileira da
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal de Juiz de Fora, como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Leda Marília Fonseca Lucinda

Juiz de Fora

2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Áurea e Antonio (*in memoriam*), por serem meus pilares, meus maiores incentivadores e aqueles que sempre acreditaram em meu potencial. Se hoje alcancei este marco, é graças a vocês e ao amor inestimável que sempre me proporcionaram.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, por compartilharem comigo a alegria de cada pequena conquista.

Ao meu marido Daniel e amados filhos, Davi e Laís, por estarem ao meu lado e me apoiarem incondicionalmente, sendo meu refúgio durante os momentos mais desafiadores. Agradeço por compreenderem meus períodos de ausência e por serem minha fonte de inspiração constante.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro, pelos valiosos conselhos e pela orientação brilhante que moldaram cada passo deste estudo. Sou grata por ter tido a oportunidade de aprender com um profissional tão competente e inspirador. Sua paciência e confiança em meu trabalho foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Leda Marília Fonseca Lucinda, por sua dedicação em me auxiliar na condução deste estudo, em especial na condução dos experimentos e análise dos dados.

Ao Prof. Dr. Maycon de Moura Reboredo, por sua colaboração e por compartilhar seu conhecimento durante esta jornada acadêmica, enriquecendo este trabalho.

À Prof^a. Lídia Maria Carneiro da Fonseca, por toda disponibilidade e paciência em me ensinar e auxiliar durante toda a fase experimental. Sempre

serei grata pelo seu inestimável apoio.

Ao Prof. Dr. Marcus da Matta Abreu, por compreender e apoiar minha jornada acadêmica, permitindo que eu cumprisse minhas atividades quando precisei me ausentar.

A Prof^a. Dr^a. Kelli Borges dos Santos, por sempre me incentivar na carreira acadêmica, acreditando em mim desde os primeiros passos.

Aos demais colegas e acadêmicos do Núcleo de Pneumologia, pela enriquecedora troca de conhecimentos e experiências.

Aos integrantes do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF, por nos acolherem e por nos proporcionarem um ambiente propício para a execução dos experimentos. Sua contribuição foi essencial para o sucesso deste trabalho.

À Faculdade de Farmácia da UFJF, pela fundamental contribuição, fornecendo o insumo necessário para a realização deste estudo. Sem o apoio de vocês, esta pesquisa não seria possível.

A todos que direta ou indiretamente participaram desta jornada, meu sincero agradecimento. Cada um de vocês deixou sua marca em minha trajetória, tornando esta conquista ainda mais significativa. Que este trabalho possa contribuir positivamente para o conhecimento acadêmico e científico, assim como cada um de vocês contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

Introdução: A lesão pulmonar associada ao esforço respiratório espontâneo pode piorar a lesão pulmonar aguda (LPA) inflamatória. Nosso objetivo, portanto, foi comparar a lesão pulmonar e a inflamação após um período de hiperventilação espontânea induzida pela administração venosa de cloreto de amônio (NH_4Cl) em ratos com e sem lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS) intraperitoneal.

Métodos: Ratos Wistar foram randomizados em dois grupos para receber LPS intraperitoneal ou solução salina. Após 24 horas, cada grupo foi randomizado para receber NH_4Cl intravenoso durante 180 minutos, ou solução salina. Foram construídos quatro grupos: controle-controle (C-C), controle-hiperventilação (C-HV), LPS-controle (LPS-C) e LPS-hiperventilação (LPS-HV). Após 180 minutos, foi coletada gasometria venosa para confirmar a ocorrência de acidose metabólica e hiperventilação. Os animais foram eutanasiados e a lesão pulmonar foi avaliada pelo escore de LPA, quantificação morfométrica do edema perivascular, número de neutrófilos no lavado broncoalveolar (LBA), expressão de mRNA de marcadores biológicos no tecido pulmonar.

Resultados: A hiperventilação induziu lesão pulmonar inflamatória em pulmões previamente normais e piorou a lesão previamente induzida por LPS (escore de LPA: C-C=0,14 [IQR 0,12; 0,14]; C-HV=0,36 [IQR 0,31; 0,37]; LPS-C=0,51 [IQR 0,50; 0,54]; LPS-HV=0,58 [IQR 0,56; 0,62]; $p<0,01$). Edema perivascular, contagem de neutrófilos no LBA e expressão de mRNA de anfiregulina foram maiores no grupo LPS-HV.

Conclusão: A hiperventilação aumentou a lesão pulmonar inflamatória em ratos com LPA durante ventilação espontânea. Estes resultados sugerem que

devemos continuar a estudar o papel dos esforços espontâneos vigorosos no agravamento da lesão pulmonar inflamatória.

Palavras chaves: Lesão pulmonar aguda; sepse; lipopolissacarídeos; síndrome de desconforto respiratório agudo, hiperventilação.

ABSTRACT

Introduction: Lung injury associated with spontaneous respiratory effort can worsen inflammatory acute lung injury (ALI). Our objective, therefore, was to compare lung injury and injury after a period of hyperventilation caused by intravenous administration of ammonium chloride (NH_4Cl) in rats with and without acute lung injury caused by intraperitoneal lipopolysaccharide (LPS).

Methods: Wistar rats were randomized into two groups to receive intraperitoneal LPS or saline. After 24 hours, each group was randomized to receive intravenous NH_4Cl over 180 minutes, or saline. Four groups were constructed: control-control (C-C), control-hyperventilation (C-HV), LPS-control (LPS-C) and LPS-hyperventilation (LPS-HV). After 180 minutes, venous blood gas analysis was collected to confirm the occurrence of metabolic acidosis and hyperventilation. The animals were euthanized and lung injury was assessed by the LPA score, morphometric quantification of perivascular edema, number of neutrophils in bronchoalveolar lavage (BAL), mRNA expression of biological markers in lung tissue.

Results: Hyperventilation induced lung inflammatory injury in previously normal lungs and worsened injury previously caused by LPS (LPA score: C-C=0.14 [IQR 0.12, 0.14]; C-HV=0.36 [IQR 0.31; 0.37]; LPS-C=0.51 [IQR 0.50; 0.54]; LPS-HV=0.58 [IQR 0.56; 0.62]; $p<0.01$). Perivascular edema, BAL neutrophil count, and amphiregulin mRNA expression were higher in the LPS-HV group.

Conclusion: Hyperventilation increased lung inflammatory injury in rats with ALI during spontaneous ventilation. These results suggest that we should continue to study the role of vigorous spontaneous efforts in worsening inflammatory lung injury.

Keywords: Acute lung injury; sepsis; lipopolysaccharides; acute respiratory distress syndrome, hyperventilation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios diagnósticos para a nova definição global de síndrome do desconforto respiratório agudo

Tabela 2: Escore de lesão pulmonar preconizado pela *American Thoracic Society*

Tabela 3: Primers para métodos quantitativos de PCR em tempo real

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Animais em decúbito ventral, rebendo infusão contínua intravenosa

Figura 2. Linha do tempo do experimento

Figura 3. Corte histológico de parênquima pulmonar sob retículo para morfometria

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS: *American Thoracic Society*

CBR-UFJF: Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora

CC16: proteína dezesseis de célula clara

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CNAF: Cateter nasal de alto fluxo

CPAP: Pressão positiva contínua nas vias aéreas

DAMPs: Padrões moleculares associados a danos

EP: Pontos em área de edema perivascular

F_IO₂: Fração inspirada de oxigênio

FR: Frequência respiratória

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HCO₃⁻: Bicarbonato

I:E: Relação inspiração e expiração

ICAM 1: molécula de adesão intercelular um

IRpA: Insuficiência respiratória aguda

LBA: Lavado broncoalveolar

LPA: Lesão pulmonar aguda

LPS: Lipopolissacáride

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

NH₄Cl: Cloreto de amônia

PaO₂: Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial

PBS: Solução de tampão fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

P_L: Pressão transpulmonar

P_{pl}: Pressão pleural

P_{plat}: Pressão de platô

P-SILI: Lesão pulmonar autoinfligida pelo paciente

PvCO₂: Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue venoso

SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo

SF 0,9%: Soro fisiológico 0,9%

SpO₂: Saturação periférica de oxigênio

UTI: Unidade de terapia intensiva

V/Q: Relação ventilação- perfusão

V: Pontos em área do vaso

VILI: lesão pulmonar induzida pelo ventilador

VM: Ventilação mecânica

VNI: Ventilação não invasiva

V_T: Volume corrente

*“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé
sobre o ombro de gigantes”*

Isaac Newton

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Síndrome do desconforto respiratório agudo	18
2.2. Lesão pulmonar induzida pela ventilação	23
2.3. Esforços espontâneos durante a ventilação mecânica e o conceito de lesão pulmonar autoinfligida pelo paciente	25
2.4. Modelos animais de lesão pulmonar aguda	30
2.5. Modelos animais de acidose e hiperventilação	32
3. HIPÓTESES	34
4. OBJETIVOS	35
4.1. Objetivo geral	35
4.2. Objetivos específicos	35
5. MÉTODOS	36
5.1. Seleção e cuidado dos animais	36
5.2. Grupos experimentais	37
5.3. Protocolo experimental	37
5.3.1. Protocolo para indução de sepse e lesão pulmonar aguda	37
5.3.2. Protocolo para indução de acidose e hiperventilação	38
5.3.3. Coleta de sangue venoso, eutanásia e remoção dos pulmões	39
5.4. Variáveis analisadas	41
5.4.1. Gasometria venosa	41

5.4.2.	Histologia pulmonar	42
5.4.3.	Morfometria para quantificação do edema pulmonar perivascular ..	43
5.4.4.	Lavado broncoalveolar	45
5.4.5.	Expressão de mRNA de ICAM- 1, CC16 e anfirregulina	45
5.5.	Análise estatística	47
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
8.	CONCLUSÕES	52
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
10.	APÊNDICES	62
11.	ANEXOS	87

1. INTRODUÇÃO

A ventilação mecânica (VM) desempenha um papel essencial no tratamento de muitos pacientes que apresentam formas graves de insuficiência respiratória aguda (IRpA)(1) No entanto, a própria VM, em combinação com sedação e, eventualmente, paralisia neuromuscular, pode levar a complicações, como infecções, atrofia muscular, problemas cognitivos e mesmo agravamento da lesão pulmonar existente (2) Além disso, a aplicação de pressão positiva nos pulmões com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) durante a VM causa uma expansão pulmonar desigual, com maior ventilação das regiões ventrais em comparação com as dorsais. Esse padrão ventilatório prejudica o equilíbrio entre ventilação e perfusão (V/Q) e, conseqüentemente, afeta a eficiência das trocas gasosas pulmonares(3)

Uma alternativa para mitigar alguns desses efeitos deletérios é permitir que os pacientes façam esforços respiratórios espontâneos durante a VM, o que tem sido reconhecido em estudos experimentais e clínicos como um meio de aumentar a aeração pulmonar e melhorar a V/Q e a oxigenação (4) Além disso, existem potenciais benefícios adicionais, como melhora no desempenho hemodinâmico, prevenção da atrofia diafragmática, maior conforto para o paciente e redução da necessidade de sedação e/ou paralisia muscular (5)

Contudo, nos últimos anos, surgiram evidências de que os esforços respiratórios espontâneos podem causar ou agravar a lesão pulmonar, especialmente em pulmões já gravemente lesados ou quando os esforços são intensos(6–9) Esses esforços reduzem a pressão pleural (P_{pl}), aumentando a pressão transpulmonar (P_L) e o volume corrente (V_T), dois fatores associados à lesão pulmonar (10)

Em pulmões gravemente comprometidos e com distribuição heterogênea da aeração, o esforço espontâneo pode aumentar o *stress* pulmonar local, levando à lesão pulmonar mesmo com baixo V_T . Além disso, a P_{pl} negativa aumenta a pressão vascular transmural, ou seja, a diferença entre a pressão intravascular e extravascular, favorecendo o extravasamento de fluidos para o interstício pulmonar e espaço alveolar. Esse tipo de lesão pulmonar induzida pelos esforços do paciente foi denominado "lesão pulmonar autoinfligida pelo paciente" (P-SILI) (11)

Durante a pandemia de COVID-19, o conceito de P-SILI foi expandido para pacientes sem suporte ventilatório mecânico. Alguns autores postularam que os esforços inspiratórios espontâneos intensos podem piorar a lesão e o edema pulmonar por aumentar o estresse tecidual e as pressões transvasculares pulmonares (12,13) Esses autores sugeriram uma intubação precoce e o uso de sedação eficaz, com ou sem paralisia, para interromper esse ciclo. No entanto, ainda não se sabe em que medida os esforços inspiratórios são capazes de agravar a lesão pulmonar e se os possíveis benefícios da intubação precoce superam os riscos inerentes à VM invasiva.

Apesar do conhecimento de que os esforços respiratórios espontâneos podem agravar uma lesão pulmonar existente, sua magnitude e as vias inflamatórias envolvidas não estão completamente esclarecidas. Nesse sentido, em nosso estudo utilizamos um modelo estabelecido de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacáride (LPS) e avaliamos o impacto da hiperventilação induzida por acidose metabólica sobre essa LPA, em ratos durante a ventilação espontânea.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Síndrome do desconforto respiratório agudo

A SDRA é uma forma de IRpA hipoxêmica que decorre de lesão de natureza inflamatória da membrana alvéolo-capilar, aumentando sua permeabilidade, o que resulta em edema alveolar. Essa lesão compromete também o epitélio alveolar e, conseqüentemente, os pneumócitos tipo II, com redução da produção de surfactante e propensão ao colapso alveolar (14,15)

Desde sua descrição inicial por Ashbaugh *et al.* (16) a SDRA já passou por várias definições. A última, estabelecida em 2023, foi denominada Definição Global de SDRA e inclui critérios relacionados aos fatores de risco, origem do edema, tempo de evolução, imagem torácica, oxigenação e suporte ventilatório recebido (17) Sendo assim, o edema deve ser precipitado por um fator de risco agudo, que pode ser pulmonar ou não pulmonar, e ele não pode ser atribuído exclusivamente ou prioritariamente a falência cardíaca ou sobrecarga de volume. Vale ressaltar que a SDRA pode ser diagnosticada na presença de falência cardíaca ou sobrecarga volêmica, desde que um fator de risco inflamatório esteja presente. As alterações de trocas gasosas também não podem ser decorrentes primariamente de atelectasias. Em relação ao tempo, a definição estabelece um período de sete dias entre o início do fator predisponente e o surgimento ou agravamento da IRpA hipoxêmica. O edema pulmonar deve ser confirmado por opacidades bilaterais na radiografia ou tomografia computadorizada de tórax, ou por linhas B ou consolidações bilaterais na ultrassonografia. Essas alterações de

imagem não podem ser explicadas completamente por derrame pleural, atelectasias, nódulos ou massas pulmonares (17).

Em relação à oxigenação e ao suporte ventilatório, a SDRA passou a ser classificada em duas categorias iniciais: pacientes não intubados e pacientes intubados. Entre os não intubados, o paciente deve estar recebendo oxigênio por cânula nasal de alto fluxo (CNAF), com fluxo de pelo menos 30 L/min, ventilação não-invasiva (VNI) ou pressão positiva contínua nas vias aéreas (CPAP) de pelo menos 5 cmH₂O e apresentar PaO₂/FiO₂ menor que 300 ou SpO₂/FiO₂ menor que 315 (desde que SpO₂ menor que 97%). Neste grupo, aceita-se o diagnóstico mesmo sem o suporte com CNAF ou VNI/CPAP, em situações em que eles não sejam disponíveis, em uma categoria denominada “critérios modificados em locais de recursos variáveis”. Entre os pacientes intubados, a SDRA continua sendo classificada em leve, moderada ou grave, mas também aceitando-se a relação SpO₂/FiO₂ para essa classificação, desde que a SpO₂ esteja abaixo de 97%, sendo: leve com PaO₂/FiO₂ entre 200 e 300 ou SpO₂/FiO₂ entre 235 e 315; moderada com PaO₂/FiO₂ entre 100 e 200 ou SpO₂/FiO₂ entre 148 e 235; e grave com PaO₂/FiO₂ menor que 100 ou SpO₂/FiO₂ menor que 148 (Tabela 1).

Tabela 1: Critérios Diagnósticos para a Nova Definição Global de SDRA (17)

Critérios que se aplicam a todas as categorias de SDRA			
Fatores de risco e origem do edema	Desencadeado por um fator de risco predisponente agudo, como pneumonia, infecção não pulmonar, trauma, transfusão, aspiração ou choque. O edema pulmonar não é exclusiva ou primariamente atribuível a edema pulmonar cardiogênico/sobrecarga de fluidos, e as anormalidades de hipoxemia/troca gasosa não são principalmente atribuíveis a atelectasia. No entanto, a SDRA pode ser diagnosticada na presença dessas condições se um fator de risco predisponente para a SDRA também estiver presente.		
Tempo	Início agudo ou piora da insuficiência respiratória hipoxêmica dentro de 1 semana do início estimado do fator de risco predisponente ou de novos sintomas respiratórios ou piora dos sintomas respiratórios.		
Imagem torácica	Opacidades bilaterais na radiografia ou tomografia computadorizada de tórax, ou linhas B e/ou consolidações bilaterais por ultrassonografia, não completamente explicadas por derrames, atelectasias ou nódulos/massas.		
Critérios que se aplicam a categorias específicas de SDRA			
	SDRA em pacientes não intubados	SDRA em pacientes intubados	Definição modificada para situações de recurso variável.
Oxigenação	PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 300 ou SpO ₂ /FiO ₂ ≤ 315 (se SpO ₂ ≤ 97%) em CNAF com fluxo ≥ 30l/min ou VNI/CPAP com PEEP ≥ 5 cm/H ₂ O	Leve: 200 < PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 300 ou 235 ≤ SpO ₂ /FiO ₂ ≤ 315 (se SpO ₂ ≤ 97%) Moderada: 100 < PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 200 ou 148 < SpO ₂ /FiO ₂ ≤ 235 (se SpO ₂ ≤ 97%) Grave: PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 100 ou SpO ₂ /FiO ₂ ≤ 148 (se SpO ₂ ≤ 97%)	SpO ₂ /FiO ₂ ≤ 315 (se SpO ₂ ≤ 97%). PEEP ou fluxo mínimo de oxigênio não são necessários para o diagnóstico em ambientes com recursos variáveis.

SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo; PaO_2 : pressão parcial de oxigênio no sangue arterial; FiO_2 : fração inspirada de oxigênio; SpO_2 : saturação periférica de oxigênio; CNAF: cateter nasal de alto fluxo; VNI: ventilação não-invasiva; CPAP: pressão positiva contínua em vias aéreas; PEEP: pressão positiva no final da expiração.

A SDRA é uma das causas importantes de admissão nas unidades de terapia intensiva (UTIs) e de necessidade de VM. O VENTILA-GROUP, que periodicamente conduz estudos de coorte que caracterizam os perfis de pacientes em VM em todo mundo, mostrou que a SDRA representou entre 3% e 4,5% dos pacientes submetidos a VM em diferentes países, nos anos de 1998, 2004, 2010 e 2016 (18). Já o LUNG SAFE, que avaliou pacientes internados em 459 UTIs em 50 países, mostrou que a SDRA representou 10,4% (IC-95%, 10,0%-10,7%) das admissões e 23,4% (IC-95%, 21,7%-25,2%) daquelas em que os pacientes receberam VM (19). No Brasil, os dados epidemiológicos sobre SDRA são escassos, mas um estudo observacional multicêntrico encontrou incidência de 10,1 casos/100.000 habitantes/ano (20)

Apesar de todos os avanços ocorridos na condução dos pacientes graves desde a descrição da SDRA, sua mortalidade permanece elevada. No estudo LUNG SAFE, nos pacientes com diagnóstico de SDRA, a mortalidade na UTI foi de 35,8% e a hospitalar foi de 40% (19). Já no Brasil, um estudo conduzido por Azevedo *et al.* mostrou que a mortalidade na UTI foi de 46% e a hospitalar foi de 52% (21)

O processo inflamatório que resulta na SDRA pode ser iniciado por diferentes condições clínicas, as quais são didaticamente classificadas como pulmonares ou extra-pulmonares, conforme a agressão inicie-se no epitélio alveolar ou no endotélio capilar, respectivamente (22) As causas pulmonares mais comuns são pneumonia, broncoaspiração, trauma pulmonar, embolia gordurosa, quase afogamento e inalação de gases tóxicos. Entre as causas extra-pulmonares destacam-se a sepse, politrauma, pancreatite aguda, múltiplas transfusões, queimaduras extensas e circulação extracorpórea (23)

Na sepse, que é provavelmente a causa mais frequente de SDRA, a lesão da membrana alvéolo-capilar ocorre por desequilíbrio na cascata inflamatória. A ativação imune efetiva para combater a infecção pode tornar-se excessiva e resultar em lesão pulmonar(24) Estímulos como hipóxia, citocinas, quimiocinas, trombina, LPS e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) alteram o endotélio, tornando-o permeável, atraindo células inflamatórias e ativando a cascata extrínseca de coagulação (14) Durante a lesão pulmonar, concentrações aumentadas de trombina, fator de necrose tumoral- α , fator de crescimento endotelial vascular e leucócitos desestabilizam as ligações caderina de endotélio vascular, uma proteína de junção que é necessária para manter a integridade da barreira endotelial na microcirculação pulmonar, resultando em aumento da permeabilidade endotelial e acúmulo de fluido alveolar (25)

Na face epitelial da membrana alvéolo-capilar, produtos de bactérias e DAMPs ligam-se a receptores do tipo *Toll-like* no epitélio pulmonar e a macrófagos alveolares, ativando o sistema imunológico inato e levando à formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos e liberação de histonas, além de gerar espécies reativas de oxigênio, proteases leucocitárias, quimiocinas e citocinas (26,27) Este processo auxilia na neutralização de patógenos, mas também resulta em piora da lesão pulmonar. A resposta ao insulto também causa apoptose ou necrose epitelial e ruptura das junções intercelulares do epitélio alveolar, contribuindo para o aumento da permeabilidade epitelial (14,24) Além de todos os fatores que favorecem a formação de edema pulmonar, na SDRA, a capacidade de remoção do líquido também é reduzida, o que é denominado comprometimento da depuração do líquido alveolar (24)

Sob uma perspectiva mecânica, a SDRA apresenta uma reduzida complacência pulmonar, em grande parte atribuída ao fenômeno conhecido como "*baby lung*" (28) Este conceito surgiu a partir de estudos que utilizaram avaliação tomográfica para investigar as alterações pulmonares na SDRA, revelando uma distribuição heterogênea das lesões, com maior colapso alveolar nas regiões mais dependentes da gravidade(29,30) Dessa forma, a região não dependente, normoaerada e denominada de "*baby lung*" por apresentar o tamanho do pulmão de uma criança, recebe o V_T ofertado, estando sujeito a maiores níveis de tensão (3)

2.2. Lesão pulmonar induzida pela ventilação

O tratamento da SDRA envolve, frequentemente, suporte ventilatório devido ao comprometimento grave das trocas gasosas observado nessa condição. Em casos leves, é possível utilizar VNI ou CNAF (31) No entanto, em situações mais graves, são necessárias intubação traqueal e VM invasiva para garantir a adequada oxigenação e ventilação pulmonar (2)

Embora fundamental no tratamento da SDRA, a VM pode lesar o pulmão, sobretudo quando ajustada de forma inadequada. Essa lesão, denominada VILI (do inglês, *ventilator-induced lung injury*), assemelha-se histopatologicamente à SDRA, sendo caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório, membrana hialina e edema decorrente do aumento da permeabilidade vascular (32)

A VILI pode ser entendida por meio dos conceitos de *strain* e *stress*, que

resultam das modificações dos volumes pulmonares e das pressões geradas durante a inspiração. O *strain* é a deformação dos pulmões decorrente de sua insuflação pelo V_T , sendo o risco de VILI diretamente proporcional a ele. Assim, não só o valor absoluto do V_T é importante, mas também o quanto ele representa em relação à capacidade residual funcional, ou seja, a área pulmonar aerada ao final da expiração (33) Isso faz com que o mesmo V_T que pode ser seguro na ventilação de um pulmão bem aerado, possa causar VILI em um pulmão com SDRA, que apresenta extensas áreas colapsadas e/ou edemaciadas (34) O *stress* representa as forças que são geradas na estrutura pulmonar durante a oferta do V_T e corresponde à P_L . Clinicamente o *stress* pode ser estimado pela pressão de platô (P_{plat}), desde que o paciente não apresente esforços inspiratórios.

Os primeiros parâmetros ventilatórios que foram associados à ocorrência de VILI por meio de estudos experimentais foram os altos V_T e as altas pressões de vias aéreas (35) Posteriormente, verificou-se que altos V_T gerados por grandes esforços durante a inspiração, sem elevar as pressões nas vias aéreas, também podem causar VILI (36) Isso ocorre porque a pressão que se associa à VILI é a P_L , resultado da diferença entre a pressão de vias aéreas e a P_{pl} (37) A P_L pode elevar-se tanto pelo aumento da pressão de vias aéreas, quanto pela redução da P_{pl} negativa, que representa a intensidade do esforço do paciente (38)

Após a compreensão da relevância da P_L no desenvolvimento da VILI, maior atenção tem sido direcionada aos esforços inspiratórios espontâneos do paciente como um possível fator de lesão pulmonar. Isso ocorre tanto durante a VM, quanto durante a VNI ou mesmo na ventilação espontânea com

fornecimento de oxigênio em diferentes modalidades, incluindo o CNAF (6,11,39)

2.3. Esforços espontâneos durante a ventilação mecânica e o conceito de lesão pulmonar autoinfligida pelo paciente

Ao longo de anos, estudos experimentais e clínicos demonstraram os benefícios da presença de esforços espontâneos durante a VM (4,40) Em relação às trocas gasosas, os esforços espontâneos as melhoram por diferentes mecanismos. Durante a inspiração, a contração diafragmática aumenta a P_L , resultando em maior expansão pulmonar. Na expiração, o relaxamento diafragmático com manutenção de certo tônus muscular reduz a perda de volume ao final da expiração, prevenindo o colapso e favorecendo o recrutamento alveolar. Isso leva a maior superfície alveolar ventilada, melhorando a V/Q e, por consequência, as trocas gasosas (41) Além disso, esse recrutamento alveolar permite que o V_T se distribua por uma maior área de alvéolos, reduzindo o *stress* e o *strain* gerados, minimizando o potencial de VILI (40) Os esforços espontâneos promovem ainda uma distribuição mais homogênea do ar entre as regiões pulmonares ventrais e dorsais, enquanto sem a contração muscular o V_T é preferencialmente distribuído para as regiões ventrais. Essa melhor distribuição do V_T para as áreas dorsais com os esforços espontâneos contribui para melhora na relação V/Q , pois essas regiões são mais profundas (42)

Além desses benefícios relacionados às trocas gasosas, os esforços

espontâneos na VM trazem outras vantagens. Eles previnem ou reduzem a atrofia diafragmática associada à inatividade durante a VM controlada, melhoram o retorno venoso e o débito cardíaco, e também promovem melhor drenagem linfática no interstício pulmonar. Todos esses fatores contribuem para otimizar a ventilação e minimizar o risco de VILI (5)

A despeito desses benefícios, existem evidências de efeitos potencialmente deletérios dos esforços respiratórios espontâneos em pacientes com LPA. Em um estudo experimental pioneiro, em 1988, Mascheroni *et al.* induziram hiperventilação em ovelhas, por meio da instilação de salicilato de sódio na cisterna magna, o que resultou em aumento do V_T e da ventilação minuto. Após algumas horas de hiperventilação espontânea, os animais desenvolveram lesão pulmonar, caracterizada por hipoxemia, redução da complacência do sistema respiratório e opacidades alveolares na radiografia de tórax. À necropsia, os pulmões dos animais submetidos à hiperventilação apresentavam-se com lesões grosseiras, sendo a mais comum a presença de atelectasias. Também observou-se aumento da relação peso úmido/peso seco, um marcador de edema pulmonar (43)

A partir desse estudo, pesquisas experimentais subsequentes confirmaram que a ventilação espontânea sobreposta à VM pode piorar a lesão pulmonar. Um estudo experimental com coelhos revelou que, apesar de VM com P_{plat} limitada a 30 cmH₂O, a presença de forte esforço inspiratório, gerando moderado V_T , causou lesão pulmonar mais grave comprovada histologicamente, provavelmente devido a P_L aumentada (6) Em outro estudo, o mesmo grupo comparou VM controlada com bloqueio neuromuscular com VM associada a respiração espontânea, em modelos animais com LPA leve (por depleção de

surfactante por lavagem pulmonar) e grave (depleção de surfactante seguida de lesão induzida por VM). Os resultados indicaram que, na LPA leve, a respiração espontânea foi benéfica, melhorando a oxigenação e a aeração pulmonar pela redistribuição do V_T . No entanto, no grupo de animais com lesão pulmonar grave, a respiração espontânea resultou em níveis mais elevados de proteína total no LBA do que no grupo com paralisia muscular e escores histológicos de lesão pulmonar mais altos, sugerindo que a paralisia muscular poderia ser protetora em casos de lesão pulmonar grave, evitando aumento da P_L . Esse fenômeno torna-se mais importante porque a intensidade dos esforços inspiratórios tende a ser proporcional à gravidade da lesão pulmonar existente, ou seja, os esforços são maiores nas condições em que o risco de VILI já é mais alto (39)

A presença de lesão pulmonar e sua intensidade influenciam o impacto dos esforços espontâneos durante a VM. Enquanto em pulmões normais a contração diafragmática reduz a P_{pl} uniformemente sobre a superfície pulmonar, esse comportamento não se repete em pulmões lesados. Na SDRA, há maior negativação da P_{pl} nas porções dependentes da gravidade, promovendo uma insuflação inicial dessas regiões, ao mesmo tempo em que há deflação das regiões não dependentes, um fenômeno denominado *Pendelluft* (7,11) Esse comportamento tem implicações relevantes no estabelecimento de uma VM protetora, visto que é capaz de promover hiperdistensão regional (nas regiões dependentes), mesmo com o emprego de V_T limitados e na presença de níveis considerados protetores de P_{plat} . Para a detecção dessa hiperdistensão regional, potencialmente lesiva, é necessária a monitorização também regional e dinâmica da ventilação, o que pode ser obtido, por exemplo, com a tomografia de impedância elétrica (7)

Outro mecanismo de lesão pulmonar por esforços espontâneos é a predisposição que eles determinam à formação de edema intersticial, sobretudo em pulmões já com lesão inflamatória, nos quais a permeabilidade vascular está aumentada. Durante esforços espontâneos, a negatização da P_{pl} reduz a pressão intersticial em magnitude maior do que reduz a pressão no interior dos vasos intratorácicos, o que leva ao aumento da pressão transmural nos vasos pulmonares. Esse aumento de pressão transmural vascular favorece a saída de líquido para o interstício, fenômeno amplificado pelo aumento do retorno venoso e pelo aumento da permeabilidade vascular. Esse mecanismo de lesão é particularmente importante na ventilação volume-controlada, na qual o aumento do esforço inspiratório não é acompanhado de aumento de fluxo e V_T , gerando P_{pl} muito negativa (11,44,45)

Mais recentemente, estudos clínicos trouxeram evidências indiretas de que esforços espontâneos podem agravar o quadro de pacientes com LPA, mesmo sem VM invasiva. Um ensaio clínico randomizado, por exemplo, conduzido em pacientes com IRpA hipoxêmica, mostrou piores desfechos clínicos (maiores taxas de intubação e mortalidade) com o emprego da VNI, em comparação com CNAF. Os pacientes que receberam VNI apresentaram V_T médio de 9 ml/kg de peso predito, valor sabidamente associado à VILI, fato que pode explicar a pior evolução com esse suporte ventilatório (46)

Corroborando essa hipótese, Carteaux *et al.* mostraram que, entre pacientes com SDRA conduzidos com suporte ventilatório não-invasivo, aqueles que falharam e necessitaram de intubação receberam V_T significativamente maiores. Em análise multivariada, o valor do V_T associou-se de forma estatisticamente significativa com a falha da VNI, sendo que este efeito foi mais

marcante nos pacientes mais graves, com $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ menor que 200 mmHg (47)

Especula-se que pacientes com LPA e com drive ventilatório excitado podem ter a lesão agravada por hiperventilação espontânea. Essa lesão, semelhante à descrita na VILI e à decorrente por esforços espontâneos durante a VM, não tem, entretanto, a participação do ventilador e por isso foi denominada P-SILI (11)

Com base nesses conhecimentos provenientes de estudos experimentais e observações clínicas, diante de um paciente com IRpA hipoxêmica com *drive* respiratório aumentado, deve-se considerar o risco de P-SILI e instituir medidas de suporte com potencial de redução desse risco (48) Essas medidas incluem a correção da hipoxemia pela oferta de oxigênio e a redução do trabalho ventilatório, com as possibilidades de uso da CNAF e da VNI. O uso da VNI, entretanto, deve ser judicioso, com rigorosa monitorização do V_T e ajustes adequados para que ele fique na faixa segura, entre 6 e 8 ml/kg de peso predito (49)

Alguns autores sugerem a intubação precoce na IRpA hipoxêmica como prevenção da P-SILI, conduta essa muito debatida durante a pandemia de COVID-19 (13) Certamente a VM com o paciente adequadamente sedado, eventualmente curarizado nos primeiros dias de suporte ventilatório, previne a P-SILI. Porém, ainda não há evidências definitivas sobre a extensão do agravamento da lesão pulmonar pelos esforços espontâneos, bem como a partir de qual grau de lesão os benefícios de sua prevenção suplantam os riscos associados à VM (12)

A P-SILI também ainda não foi adequadamente estudada em estudos experimentais. Após o estudo inicial de Mascheroni *et al.*(43), em 1988, que

mostrou a ocorrência de lesão pulmonar induzida por hiperventilação em ovelhas e respiração espontânea, a maioria dos demais estudos que abordaram o impacto de esforços espontâneos sobre a lesão pulmonar foram conduzidos durante a VM (5–7,39). Por essa lacuna no conhecimento e pela importância de se conhecer a extensão e os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na P-SILI, optamos por avaliá-la em um modelo de lesão pulmonar induzida por LPS, em ratos Wistar ventilados espontaneamente, nos quais esforços inspiratórios são induzidos pela infusão de cloreto de amônia (NH_4Cl), capaz de gerar acidose metabólica e, assim, excitação do *drive* respiratório.

2.4. Modelos animais de lesão pulmonar aguda

Os modelos animais de LPA têm desempenhado um papel fundamental no estudo da SDRA. Entretanto, esses modelos apresentam limitações devido a diferenças anatômicas e fisiológicas com os humanos, que precisam ser consideradas. Os roedores possuem a barreira alvéolo-capilar mais fina que os humanos, além de menos ramificações de vias aéreas (50). Eles também diferem dos humanos por apresentarem menos neutrófilos e produzirem menos espécies reativas de oxigênio (51).

Enquanto nos humanos os critérios de lesão pulmonar e SDRA foram bem definidos, nos modelos animais ainda existe grande variabilidade entre os pesquisadores na definição de LPA. Em 2011, a *American Thoracic Society* (ATS) descreveu a LPA experimental como uma condição multidimensional caracterizada por quatro domínios que refletem as principais características

fisiopatológicas e biológicas da SDRA humana. Para ser qualificado como LPA experimental, o modelo deveria documentar alterações de pelo menos três dos quatro domínios: evidência histológica de lesão tecidual, alteração da barreira alvéolo-capilar, presença de resposta inflamatória e disfunção fisiológica (52). Recentemente, a ATS revisou e atualizou o documento anterior, identificando as medidas relevantes dentro de cada domínio, e propôs que ao menos uma dessas medidas deva ser identificada para que aquele domínio seja considerado positivo (53).

Um dos modelos experimentais mais comumente utilizado para reproduzir LPA é a administração de LPS, que pode ser feita pelas vias intranasal, intratraqueal, endovenosa ou intraperitoneal (54,55). O LPS induz uma resposta inflamatória agressiva em ratos, semelhante àquela observada em humanos com choque séptico, sendo este um bom modelo animal para identificar as principais citocinas e mediadores inflamatórios envolvidos na indução LPA (54).

O modelo de LPA induzida por LPS intraperitoneal tem como principais vantagens a facilidade de administração e a boa reprodutibilidade da lesão obtida, a qual se caracteriza por lesão pulmonar inflamatória leve e transitória. (56,57). As alterações histopatológicas mais frequentes são congestão vascular, infiltrado intersticial e alveolar neutrofílico e espessamento do septo alveolar, as quais atingem seu ápice em 24 horas e regredem 48 a 72 horas após a administração da endotoxina (58). Nesse mesmo período, observa-se edema pulmonar, que pode ser quantificado por aumento na relação entre peso úmido e peso seco dos pulmões. A membrana hialina, considerada característica da SDRA em humanos, não é comumente observada na LPA induzida por LPS (57).

2.5. Modelos animais de acidose e hiperventilação

A homeostase ácido-base é imprescindível para a manutenção do metabolismo normal do organismo e acontece, principalmente, por meio do sistema de tampão ácido carbônico- bicarbonato, regulado pelos rins e pulmões. A mudança na concentração de íons de hidrogênio pode alterar as funções de proteínas e membranas, devendo ser rigidamente regulada (59)

As induções de acidose metabólica aguda ou crônica são utilizadas em diversos protocolos experimentais com o objetivo de estudar suas consequências fisiológicas. Mascheronni *et al* usaram um modelo animal de indução de acidose metabólica com infusão de salicilato de sódio diretamente na cisterna magna de ovelhas, para investigar os efeitos da hiperventilação espontânea. O estudo mostrou aumento significativo do V_T e da frequência respiratória (FR) nos ovinos que receberam a infusão e ventilaram espontaneamente, em relação ao grupo que também recebeu infusão mais foi submetido a sedação, bloqueio neuromuscular e VM e ao grupo controle (43)

Outra substância utilizada em modelos animais para indução de acidose metabólica é o NH_4Cl , que pode ser administrado por ingestão oral ou infusão venosa (60,61) Em 2003, um experimento com bezerros induziu acidose metabólica aguda com infusão de 1 ml/kg de 5M- NH_4Cl por uma hora através de cateter em veia jugular. Neste experimento, a infusão determinou queda do pH (7,43 para 7,18) e do HCO_3^- (28,2 para 11,9 mEq/L), acompanhada de hiperventilação e queda do dióxido de carbono total venoso (29,1 para 12,9 mM) (62) Posteriormente, Celloto *et al* investigaram os efeitos in vivo da acidose metabólica aguda por infusão venosa contínua de 6M- NH_4Cl (1 mL/kg) e da

acidose metabólica crônica por administração oral *ad libitum* de NH_4Cl 1%, sobre parâmetros hemodinâmicos e função endotelial de coelhos. O modelo foi eficaz em induzir acidose metabólica, com pH médio de 7,20 ($\pm 0,01$) e bicarbonato de 10,8 mEq/L ($\pm 0,54$), a qual se acompanhou de hiperventilação, com redução da PaCO_2 de 47,8 mmHg ($\pm 2,54$) para 23,2 ($\pm 0,74$) mmHg. Os resultados mostraram que a acidose metabólica aguda, mas não a crônica, potencializou a diminuição da pressão arterial induzida pela acetilcolina e levou ao aumento do nitrito/nitrato plasmático, reforçando seu impacto no tônus vascular e controle da pressão arterial (63)

3. HIPÓTESES

Nossa hipótese é que a hiperventilação espontânea induz inflamação e a lesão pulmonar em ratos normais e aumenta inflamação e lesão pulmonar naqueles com LPA previamente induzida por LPS intraperitoneal. Hipotetizamos ainda que a LPA prévia potencializa os efeitos deletérios da hiperventilação espontânea.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Comparar a lesão e a inflamação pulmonar após um período de hiperventilação espontânea induzida pela administração venosa de NH_4Cl em ratos com e sem LPA induzida por LPS intraperitoneal.

4.2. Objetivos específicos

Comparar as referidas lesão e inflamação pulmonar por meio de:

- Contagem de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA).
- Análise histopatológica pulmonar:
 - Escore de lesão pulmonar aguda;
 - Edema pulmonar perivascular.
- Análise da expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de molécula de adesão intercelular 1 (ICAM 1), proteína 16 de célula clara (CC16) e anfirregulina.

5. MÉTODOS

5.1. Seleção e cuidado dos animais

Para este estudo experimental, foram utilizados ratos Wistar adultos, previamente saudáveis, com peso variando entre 280 e 360 g. Os animais foram obtidos no Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR – UFJF, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil) e receberam cuidados conforme a diretriz do Conselho Nacional de Experimentação Animal (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de animais para fins científicos e didáticos, 2013) (64) O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFJF) da Universidade Federal de Juiz de Fora, em reunião de 03/05/2022, com protocolo número 017/2022 (Anexo A).

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, contendo camas de maravalha selecionadas e não esterilizadas. Além disso, as gaiolas foram equipadas com cochos para ração do tipo peletizada e recipientes para mamadeira com água filtrada, garantindo que tivessem acesso a água e ração de forma livre. Cada gaiola abrigou três animais durante os sete dias que antecederam o início do experimento. As gaiolas eram mantidas em armários climatizados (Alesco, Brasil) com lâmpadas incandescentes controladas automaticamente, estabelecendo um fotoperíodo de 12 horas de ambiente claro e 12 horas de ambiente escuro (das 18 às 6 horas).

5.2. Grupos experimentais

A partir da randomização realizada para injeção intraperitoneal de LPS ou solução salina e para injeção intravenosa de NH_4Cl ou solução salina, foram constituídos quatro grupos de animais (Apêndice A).

- Grupo controle de LPA e controle de hiperventilação (C-C, n=6);
- Grupo controle de LPA com hiperventilação (C-HV, n=6);
- Grupo com LPA e controle de hiperventilação (LPS-C, n=6);
- Grupo com LPA e hiperventilação (LPS-HV, n=7).

5.3. Protocolo experimental

5.3.1. Protocolo para indução de sepse e lesão pulmonar aguda

Os animais foram randomizados, por meio de envelopes selados, para receber, por via intraperitoneal, LPS (*Escherichia coli* lipopolysaccharides - 055:B5, Sigma — Aldrich, Israel) na dose de 5 mg/Kg (56), ou o mesmo volume de SF 0,9%. Após a injeção intraperitoneal, os animais eram alojados em gaiolas individuais, dentro de armários climatizados (Alesco, Brasil) com fotoperíodo de 12 horas de ambiente claro e 12 horas de ambiente escuro e água e ração *ad libitum*, onde permaneciam por 24 horas.

5.3.2. Protocolo para indução de acidose e hiperventilação

Vinte e quatro horas após a injeção intraperitoneal de LPS ou SF 0,9%, os animais eram pesados (Balança Filizola MF 4006033, Brasil) e anestesiados com 80 mg/kg de cloridrato de dextrocetamina (Cristália, Brasil), 8 mg/kg xilazina (Rhobifarma, Brasil) e 5 mg/kg de midazolam, por via intraperitoneal. Os animais eram posicionados em decúbito dorsal e submetidos a incisão medial na face ventral da região cervical com divulsão dos tecidos e exposição completa da veia jugular direita, que era canulada com cateter de polietileno, 20 G (Arrow, EUA) e fixada à pele com fio de seda. Após esse procedimento, era coletado sangue venoso para gasometria basal.

Os animais randomizados para hiperventilação receberam infusão venosa de 5 M (g/mol) de NH_4Cl (Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia/UFJF) na dose de 1 ml/kg diluído em 1:10 e completado com SF 0,9% até 3,5 ml, em um fluxo de 1,26 ml/h por 180 minutos. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de SF 0,9%, nas mesma taxa de infusão (Figura 1) (62)

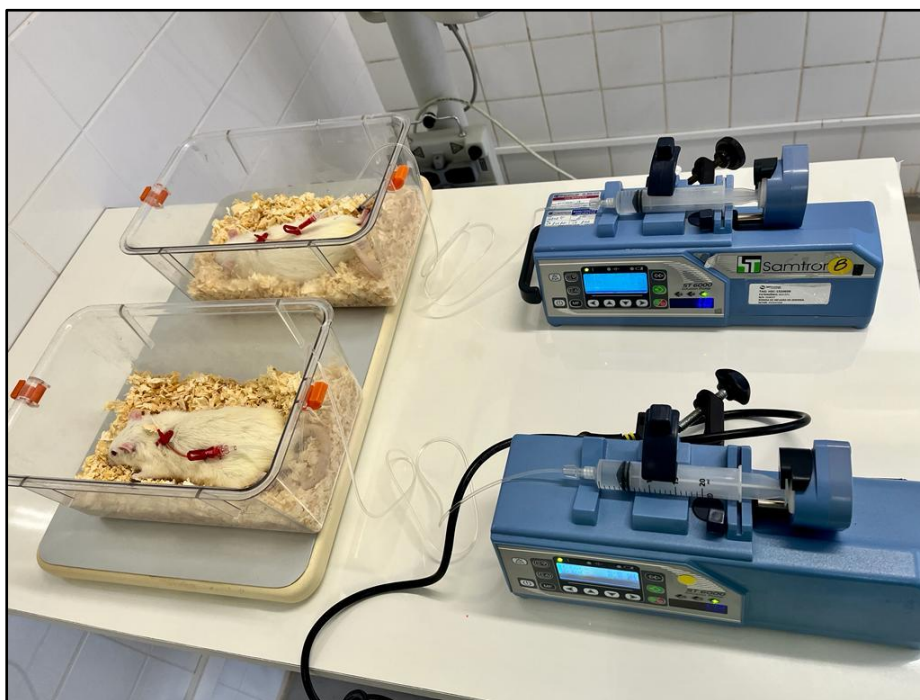


Figura 1. Animais em decúbito ventral, rebendo infusão intravenosa contínua.
Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.3. Coleta de sangue venoso, eutanásia e remoção dos pulmões

Imediatamente após o término de administração do NH_4Cl ou SF, foi realizada coleta de amostra de sangue pelo cateter para gasometria venosa. Foram considerados acidose metabólica e hiperventilação satisfatórias, valores finais de HCO_3^- menores que 15 mEq/L e redução da pressão parcial de dióxido de carbono no sangue venoso (PvCO_2) maior ou igual a 25% do valor basal.

Os animais foram novamente anestesiados com 80 mg/kg de cloridrato de dextrocetamina (Cristália, Brasil), 8 mg/kg xilazina (Rhobifarma, Brasil) e 5 mg/kg midazolam, por via intraperitoneal, para a realização de traqueostomia. A incisão anterior foi novamente aberta e o terço proximal da traqueia dissecado. Com uma lâmina de bisturi número 11 (Maxicor, Brasil), foi feita uma incisão na

traqueia, entre seus anéis de cartilagem, através da qual foi introduzida uma cânula de polietileno (PE 240, Intramedic®, Clay-Adams Inc., EUA), com 1,5 mm diâmetro interno e 7,5 cm de comprimento, fixada à pele por fio seda 2.0 (Polysuture SP420, Brasil).

Os animais foram mantidos em posição supina e acoplados, pela traqueostomia, à VM (Inspira ASV, Harvard Apparatus, EUA), com os seguintes parâmetros: modo ventilatório volume-controlado, V_T de 6 ml/Kg, FR de 80 incursões por minuto, relação inspiração:expiração (I:E) de 1:2, FiO_2 de 100% e PEEP de 5 cmH₂O. Ao término de 1 minuto, foi realizada uma pausa inspiratória no ventilador e a traqueia foi ocluída por fio de algodão, com o objetivo de manter a insuflação pulmonar. Os animais foram então submetidos a laparotomia e secção da aorta abdominal para eutanásia.

Foi realizada toracotomia bilateral, com remoção da parede torácica anterior. O esôfago foi identificado junto ao diafragma e preso por uma pinça hemostática, sendo suavemente tracionado para cima, permitindo separar o conjunto coração-pulmão das demais estruturas aderidas à parede torácica posterior. Foi realizada dissecação cervical com liberação das vias aéreas. Após completa individualização das estruturas, a traqueia foi seccionada acima da oclusão pelo fio de algodão e o conjunto de órgãos intratorácicos retirados. Posteriormente, o esôfago e o coração foram separados dos pulmões e das vias aéreas por leve tração, restando apenas os pulmões e as vias aéreas. O brônquio principal direito e o brônquio do lobo caudal direito foram ocluídos através de ligadura com um fio de algodão. O brônquio do lobo caudal direito foi seccionado acima da ligadura, mantendo a insuflação do lobo para análise histológica. O lobo cranial direito foi submetido a múltiplos cortes e o material

colocado em criotubo com TRI Reagent® (Sigma- Aldrich, EUA) para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). O pulmão esquerdo foi utilizado para realização do LBA. A figura 2 mostra o fluxo do experimento ao longo do tempo.

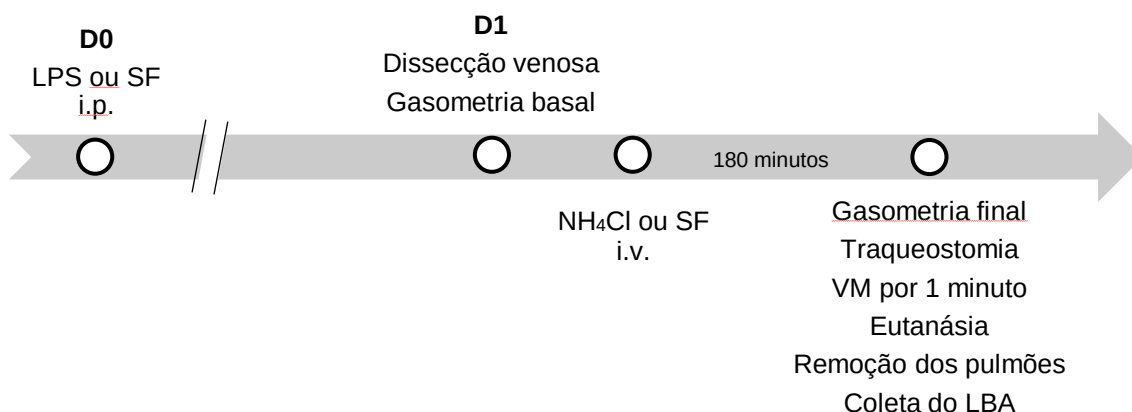


Figura 2. Linha do tempo do experimento.

D0: dia zero; D1: dia 1 (24 horas após D0); LPS: lipopolissacáride; SF: solução fisiológica; i.p.: intraperitoneal; NH₄Cl: cloreto de amônia; i.v.: intravenosa, VM: ventilação mecânica; LBA: lavado broncoalveolar.

5.4. Variáveis analisadas

5.4.1. Gasometria venosa

Aproximadamente 0,3 ml de sangue venoso foi coletado da veia jugular direita após implantação de cateter, com seringa heparinizada. A segunda coleta foi realizada após o término da infusão de NH₄Cl ou solução salina. O sangue foi analisado pelo gasômetro (ABL90 Flex Radiometer, Dinamarca) para determinação dos seguintes parâmetros: pH, PvCO₂ e HCO₃⁻.

5.4.2. Histologia pulmonar

O brônquio do lobo caudal do pulmão direito inflado foi ligado e seccionado. O lobo foi então fixado em formaldeído tamponado a 10% por 72 horas. Após esse período, foi submetido a banhos em álcool etílico e diafanizado em xilol, seguido de impregnação em parafina. Foram realizados cortes longitudinais do parênquima pulmonar, com quatro micrômetros de espessura, em micrótomo histológico rotativo Microm HM 340 (Walldorf, Germany) dotado de navalha descartável. Posteriormente, os cortes foram montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina-eosina para análise histopatológica da LPA.

A LPA foi avaliada pelo escore recomendado pela ATS (52), analisando os seguintes parâmetros: número de neutrófilos no interstício; número de neutrófilos no espaço alveolar; formação de membrana hialina; presença de debri protéico no espaço alveolar e espessura da parede alveolar. Em cada lâmina foram avaliados 20 campos diferentes, com aumento de 40x, cada campo devendo estar preenchido por alvéolos em pelo menos 50% de sua extensão. Foram excluídos campos com predomínio de grandes vasos e/ou brônquios. A análise foi feita com um microscópio de luz convencional (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha), por um avaliador cegado em relação aos grupos experimentais.

Os achados histológicos foram pontuados conforme descrito na tabela 1 e o escore foi calculado a partir da soma dos pontos obtidos em cada campo analisado, para cada uma das cinco variáveis independentes. Estes pontos foram então aplicados em uma fórmula (Equação 1), na qual cada variável recebe um peso de acordo com sua relevância na caracterização da lesão

pulmonar.

Equação 1:

$$\text{Escore} = \frac{(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)}{\text{número de campos} \times 100}$$

Tabela 2. Escore de lesão pulmonar preconizado pela *American Thoracic Society*

Parâmetros	Escore por campo		
	0	1	2
A. Neutrófilos no espaço alveolar	Nenhum	1-5	>5
B. Neutrófilos no espaço intersticial	Nenhum	1-5	>5
C. Membrana hialina	Nenhum	1	>1
D. Debrí protéico preenchendo o espaço aéreo	Nenhum	1	>1
E. Espessamento do septo alveolar	<2x	2x-4x	>4x

5.4.3. Morfometria para quantificação do edema pulmonar perivascular

O edema perivascular foi quantificado por análise morfométrica, pelo método de contagem de pontos, conforme previamente descrito (65). Todas as lâminas foram analisadas em um microscópio óptico (Zeiss, HBO 50/AC, Alemanha) acoplado a um sistema de captação digital de fotomicrografias (Axiovision, versão 4.9 para Windows). Para cada animal foram analisados e fotografados 10 campos aleatórios, com a objetiva de 40X, contendo vasos de pequeno calibre. Foram sobrepostos aos campos fotografados (aumento final de 400X) um retículo composto por 100 pontos e 50 linhas.

Um avaliador cego para os grupos experimentais determinou um

índice semi-quantitativo de edema perivascular em pequenos vasos seccionados transversalmente no parênquima pulmonar. Foram computados o número de pontos que incidiram nas áreas de edema perivascular (EP) e o número de pontos que incidiram nas áreas correspondentes ao vaso, incluindo sua luz (V), conforme ilustrado na figura 4. O índice de edema perivascular em cada campo foi calculado conforme equação 2. A seguir, foi calculada a média de cada animal, somando o índice de cada campo analisado e dividindo pelo número total de campos.

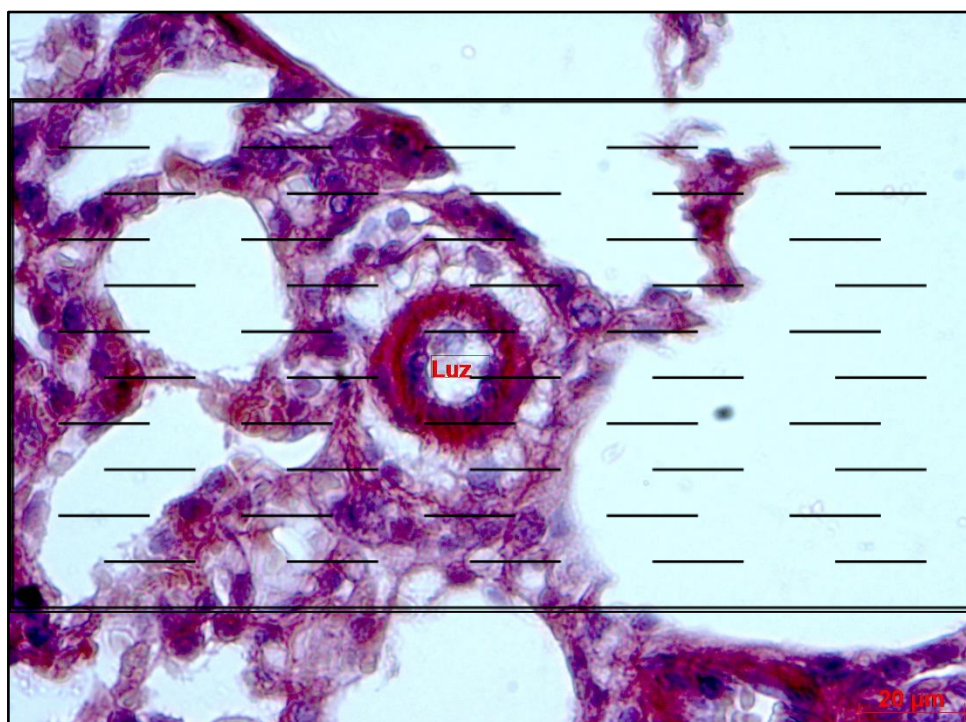


Figura 3: Corte histológico de parênquima pulmonar sob retículo para morfometria. Aumento original de 400X. H&E.
Fonte: Arquivo pessoal.

Equação 2:

$$\text{Índice de edema perivascular} = \frac{EP}{V}$$

5.4.4. Lavado broncoalveolar

O brônquio principal esquerdo foi canulado com cânula de polietileno e 4 ml de solução de tampão fosfato (PBS) com ácido etilenodiamino tetracético (10 mM) foram instilados e aspirados lentamente por três vezes, para obtenção do LBA. O material coletado foi então centrifugado e diluído solução de Turk (2% ácido acético). O sedimento de células foi novamente diluído em PBS e corado pela técnica de May-Grunwald, sendo então submetido a contagem total e diferencial de células, em uma câmara de Neubauer sob microscópio óptico (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha), com um mínimo de 300 células.

5.4.5. Expressão de mRNA de ICAM- 1, CC16 e anfirregulina

Extração de RNA total: Os lobos pulmonares craniais direitos foram seccionados e esmagados, posteriormente foram transferidos para tubos flexíveis de microcentrífuga com reagente Trizol® para extração de RNA total, por procedimento padrão. As amostras foram centrifugadas (12.000 × g, 4°C, 10 min) e os sobrenadantes foram transferidos para tubos com adição de clorofórmio, sendo as misturas novamente centrifugadas (12.000 × g, 4°C, 15 min). As fases aquosas foram então transferidas para uma solução de

isopropanol. Após a incubação em temperatura ambiente por 15 minutos, as amostras foram centrifugadas ($12.000 \times g$, 4°C , 10 min), os sobrenadantes foram descartados e o precipitado foi lavado com etanol-DEPC (80% etanol, DEPC 0,1%). Em seguida, esta solução foi centrifugada e os sobrenadantes foram retirados. O RNA total foi reconstituído em solução de água-DEPC (0,1%) e armazenado (-80°C) (66)

Síntese de DNA complementar (cDNA): A concentração e a pureza do RNA foram determinadas em um espectrofotômetro. A síntese de cDNA foi realizada usando um kit de síntese de cDNA de duas etapas (Promega, EUA). Um μg de RNA foi transcrito reversamente em cDNA usando a transcriptase reversa GoScriptTM (Promega, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, usando uma reação total de 20 μl . A reação quantitativa em cadeia de polinucleotídeos em tempo real (RT-qPCR) foi realizada usando 5 μl de SYBR Green concentrado para um volume final de 10 μl contendo 50 ng de cDNA. Para determinação da quantidade relativa inicial de cDNA, as amostras foram amplificadas com primers: ICAM 1, CC16 e anfirregulina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (tabela 2). As reações foram executadas em uma máquina Applied Biosystems 7500 RT-qPCR (Applied Biosystems, EUA). Um padrão interno foi estabelecido para normalizar o nível relativo de expressão gênica, e esse padrão foi executado com cada experimento diferente. As análises das curvas de fusão foram realizadas para todos os genes e a especificidade, bem como a integridade dos produtos de PCR, foram confirmadas pela presença de um único pico. A expressão relativa foi calculada a partir das diferenças no tempo de ciclo de um padrão interno (GAPDH) em comparação com o mRNA alvo. Valores de limiares de ciclo duplicados (CT)

foram analisados no Microsoft Excel (Microsoft) usando o método CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Applied Biosystems, EUA) (67–69)

Tabela 3: Primers para métodos quantitativos de PCR em tempo real

Genes-alvo	Primers de sequenciamento direto	Primers de sequenciamento
		reverso
GAPDH	TACATGTTCCAGTATGACTC	TAGACTCCACGACATACTC
ICAM 1	GAGCGACATTGGGGAAGACA	ACTGCTGGGAACGAATAC
CC16	CGTGAAGCTCACGGAGAAGA	AGGAGGGAGAGGGGAATGAC
Anfirregulina	ATTGTCTTTGTCTCCGCCGT	GTGCAGTCCCGTTTTCTTGC

5.5. Análise estatística

Os dados foram expressos como mediana e intervalo interquartil ou em mediana e seus valores individuais. A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Análise de variância unidirecional (ANOVA) foi empregada para comparar, entre os grupos, as variáveis com distribuição normal. Na análise *post hoc*, quando foram observadas diferenças significativas para um dos fatores (LPS ou hiperventilação) ou para a interação entre eles, o teste de Tukey foi empregado para separar diferenças entre os grupos, comparados dois a dois. Variáveis com distribuição não-normal foram comparadas pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney, caso houvesse diferença estatisticamente significativa. Os resultados estatísticos das comparações múltiplas foram ajustados pela correção de Bonferroni. Todos os testes foram bi-

caudais e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

As análises foram feitas com o programa SPSS.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados sob a forma de artigo, intitulado “Hyperventilation worsens inflammatory lung injury in rats ventilating spontaneously” (apêndice A), submetido ao periódico *Critical Care Medicine* (anexo B).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A compreensão sobre o papel da hiperventilação na progressão da LPA em pacientes em ventilação espontânea é limitada. Acredita-se que os esforços espontâneos vigorosos em tais condições conduzam a elevação da P_L , o que pode ocorrer em diferentes graus em diferentes regiões pulmonares, agravando a lesão pulmonar por mecanismos semelhantes aos descritos na VILI. Os esforços espontâneos ainda aumentam a pressão vascular transmural, favorecendo a ocorrência de edema intersticial e alveolar. Do ponto de vista clínico, esse agravamento da LPA pelos esforços espontâneos, denominado P-SILI, tem o potencial de piorar o prognóstico do paciente. O impacto negativo da P-SILI tem levado alguns autores a recomendar medidas capazes de preveni-la, incluindo a recomendação de intubação precoce.

Para contribuir com o conhecimento sobre a ocorrência da P-SILI, sua extensão e mecanismos inflamatórios envolvidos, nosso modelo investigou o impacto de esforços espontâneos em LPA em animais extubados, um campo de estudo ainda pouco explorado.

Nossos resultados mostraram agravamento da lesão pulmonar inflamatória com a hiperventilação, caracterizada por maior escore de lesão pulmonar, maior infiltração de neutrófilos nos espaços alveolares, contagem mais elevada de neutrófilos no LBA e um aumento do edema perivascular.

Os modelos escolhidos para nosso estudo mostraram limitações que prejudicaram nossas análises. A injeção de LPS por via intraperitoneal, além de lesão pulmonar, determinou acidose e hiperventilação. Com isso, provavelmente reduziu-se a diferença entre os grupos LPS-C e LPS-HV, comprometendo a

caracterização dos efeitos da hiperventilação sobre pulmões previamente lesados. Da mesma forma, é possível que a acidose metabólica induzida pelo NH_4Cl tenha levado a efeitos sistêmicos e, eventualmente com repercussões pulmonares, impedindo atribuir os resultados exclusivamente aos esforços inspiratórios. Essas limitações levam a necessidade de ajustes em nossa linha de pesquisa. Entre os ajustes, pretendemos trocar a via de administração do LPS para intra-nasal e passar a induzir a hiperventilação com doxapram, um estimulante direto do centro respiratório, que não apresenta efeitos sistêmicos.

8. CONCLUSÕES

Nossos resultados forneceram evidências de que a hiperventilação tem o efeito de aumentar a lesão inflamatória em ratos com LPA durante a ventilação espontânea vigorosa. Esse achado é particularmente relevante, pois destaca os possíveis efeitos biomecânicos resultantes de esforços espontâneos vigorosos, os quais contribuem para o agravamento da lesão pulmonar em estágios iniciais, antes mesmo da intubação.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Esteban A, Anzueto A, Alía I, et al. How is mechanical ventilation employed in the intensive care unit? An international utilization review. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(5):1450-1458. doi:10.1164/ajrccm.161.5.9902018
2. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. 2017;377(6):562-572. doi:10.1056/NEJMr1608077
3. Cressoni M, Cadringer P, Chiurazzi C, et al. Lung inhomogeneity in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(2):149-158. doi:10.1164/rccm.201308-1567OC
4. Wrigge H, Zinserling J, Neumann P, et al. Spontaneous breathing improves lung aeration in oleic acid-induced lung injury. *Anesthesiology*. 2003;99(2):376-384. doi:10.1097/00000542-200308000-00019
5. Yoshida T, Amato MBP, Kavanagh BP, Fujino Y. Impact of spontaneous breathing during mechanical ventilation in acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care*. 2019;25(2):192-198. doi:10.1097/MCC.0000000000000597
6. Yoshida T, Uchiyama A, Matsuura N, Mashimo T, Fujino Y. Spontaneous breathing during lung-protective ventilation in an experimental acute lung injury model: high transpulmonary pressure associated with strong spontaneous breathing effort may worsen lung injury. *Crit Care Med*. 2012;40(5):1578-1585. doi:10.1097/CCM.0b013e3182451c40
7. Yoshida T, Torsani V, Gomes S, et al. Spontaneous effort causes occult pendelluft during mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(12):1420-1427. doi:10.1164/rccm.201303-0539OC
8. Papazian L, Forel JM, Gacouin A, et al. Neuromuscular blockers in early acute

respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2010;363(12):1107-1116.

doi:10.1056/NEJMoa1005372

9. Forel JM, Roch A, Marin V, et al. Neuromuscular blocking agents decrease inflammatory response in patients presenting with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2006;34(11):2749-2757.
doi:10.1097/01.CCM.0000239435.87433.0D
10. Carteaux G, Parfait M, Combet M, Haudebourg AF, Tuffet S, Mekontso Dessap A. Patient-Self Inflicted Lung Injury: A Practical Review. *J Clin Med*. 2021;10(12):2738. Published 2021 Jun 21. doi:10.3390/jcm10122738
11. Brochard L, Slutsky A, Pesenti A. Mechanical ventilation to minimize progression of lung injury in acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(4):438-442. doi:10.1164/rccm.201605-1081CP
12. Tobin MJ, Jubran A, Laghi F. P-SILI as justification for intubation in COVID-19: readers as arbiters. *Ann Intensive Care*. 2020;10(1):156. Published 2020 Nov 18. doi:10.1186/s13613-020-00774-5
13. Marini JJ, Gattinoni L. Management of COVID-19 respiratory distress. *JAMA*. 2020;323(22):2329-2330. doi:10.1001/jama.2020.6825
14. Meyer NJ, Gattinoni L, Calfee CS. Acute respiratory distress syndrome. *Lancet*. 2021;398(10300):622-637. doi:10.1016/S0140-6736(21)00439-6
15. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2017;377(6):562-572. doi:10.1056/NEJMr1608077
16. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967;2(7511):319-323. doi:10.1016/s0140-6736(67)90168-7
17. Matthay MA, Arabi Y, Arroliga AC, et al. A New Global Definition of Acute Respiratory Distress Syndrome [published online ahead of print, 2023 Jul 24].

Am J Respir Crit Care Med. 2023;10.1164/rccm.202303-0558WS.

doi:10.1164/rccm.202303-0558WS

18. Peñuelas O, Muriel A, Abaira V, et al. Inter-country variability over time in the mortality of mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med.* 2020;46(3):444-453. doi:10.1007/s00134-019-05867-9
19. Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries *JAMA.* 2016;315(8):788-800. doi:10.1001/jama.2016.0291
20. Caser EB, Zandonade E, Pereira E, Gama AM, Barbas CS. Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: prospective evaluation of 7,133 patients*. *Crit Care Med.* 2014;42(3):574-582. doi:10.1097/01.ccm.0000435676.68435.56
21. Azevedo LC, Park M, Salluh JI, et al. Clinical outcomes of patients requiring ventilatory support in Brazilian intensive care units: a multicenter, prospective, cohort study. *Crit Care.* 2013;17(2):R63. doi:10.1186/cc12594
22. Pinheiro BV, Lisboa LFM, Holanda MA. Fatores de Risco na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. *Pulmão RJ;* 2011;20(1): 13-18. ID: lil-607347
23. Villar J, Blanco J, Kacmarek RM. Current incidence and outcome of the acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care.* 2016;22(1):1-6. doi:10.1097/MCC.0000000000000266
24. Huppert LA, Matthay MA, Ware LB. Pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med.* 2019;40(1):31-39. doi:10.1055/s-0039-1683996
25. Corada M, Mariotti M, Thurston G, et al. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S*

- A. 1999;96(17):9815-9820. doi:10.1073/pnas.96.17.9815
26. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):519-531. Published 2011 Jul 25. doi:10.1038/nri3024
 27. Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(12):1294-1309. doi:10.1164/rccm.200909-1427SO
 28. Gattinoni L, Pesenti A. The concept of "baby lung". *Intensive Care Med*. 2005;31(6):776-784. doi:10.1007/s00134-005-2627-z
 29. Gattinoni L, Caironi P, Pelosi P, Goodman LR. What has computed tomography taught us about the acute respiratory distress syndrome?. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(9):1701-1711. doi:10.1164/ajrccm.164.9.2103121
 30. Gattinoni L, Mascheroni D, Torresin A, et al. Morphological response to positive end expiratory pressure in acute respiratory failure. Computerized tomography study. *Intensive Care Med*. 1986;12(3):137-142. doi:10.1007/BF00254928
 31. Brochard L, Mancebo J, Wysocki M, et al. Noninvasive ventilation for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 1995;333(13):817-822. doi:10.1056/NEJM199509283331301
 32. Slutsky AS, Ranieri VM. Ventilator-induced lung injury. *N Engl J Med*. 2013;369(22):2126-2136. doi:10.1056/NEJMr1208707
 33. Gattinoni L, Protti A, Caironi P, Carlesso E. Ventilator-induced lung injury: the anatomical and physiological framework. *Crit Care Med*. 2010;38(10 Suppl):S539-S548. doi:10.1097/CCM.0b013e3181f1fcf7
 34. Terragni PP, Rosboch G, Tealdi A, et al. Tidal hyperinflation during low tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit*

- Care Med.* 2007;175(2):160-166. doi:10.1164/rccm.200607-915OC
35. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis.* 1974;110(5):556-565.
doi:10.1164/arrd.1974.110.5.556
 36. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis.* 1988;137(5):1159-1164.
doi:10.1164/ajrccm/137.5.1159
 37. Silva PL, Rocco PRM. The basics of respiratory mechanics: ventilator-derived parameters. *Ann Transl Med.* 2018;6(19):376. doi:10.21037/atm.2018.06.06
 38. Ranieri VM, Tonetti T, Nava S. Transpulmonary Pressure to Guide Mechanical Ventilation: Art or Science?. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021;204(10):1120-1121. doi:10.1164/rccm.202109-2116ED
 39. Yoshida T, Uchiyama A, Matsuura N, Mashimo T, Fujino Y. The comparison of spontaneous breathing and muscle paralysis in two different severities of experimental lung injury. *Crit Care Med.* 2013;41(2):536-545.
doi:10.1097/CCM.0b013e3182711972
 40. Neumann P, Wrigge H, Zinserling J, et al. Spontaneous breathing affects the spatial ventilation and perfusion distribution during mechanical ventilatory support. *Crit Care Med.* 2005;33(5):1090-1095.
doi:10.1097/01.ccm.0000163226.34868.0a
 41. Pellegrini M, Hedenstierna G, Roneus A, Segelsjö M, Larsson A, Perchiizzi G. The Diaphragm Acts as a Brake during Expiration to Prevent Lung Collapse. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(12):1608-1616.

doi:10.1164/rccm.201605-0992OC

42. Marini JJ. Spontaneously regulated vs. controlled ventilation of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care*. 2011;17(1):24-29. doi:10.1097/MCC.0b013e328342726e
43. Mascheroni D, Kolobow T, Fumagalli R, Moretti MP, Chen V, Buckhold D. Acute respiratory failure following pharmacologically induced hyperventilation: an experimental animal study. *Intensive Care Med*. 1988;15(1):8-14.
doi:10.1007/BF00255628
44. Bhattacharya M, Kallet RH, Ware LB, Matthay MA. Negative-Pressure Pulmonary Edema. *Chest*. 2016;150(4):927-933.
doi:10.1016/j.chest.2016.03.043
45. Lemyze M, Mallat J. Understanding negative pressure pulmonary edema. *Intensive Care Med*. 2014;40(8):1140-1143. doi:10.1007/s00134-014-3307-7
46. Frat JP, Thille AW, Mercat A, et al. High-flow oxygen through nasal cannula in acute hypoxemic respiratory failure. *N Engl J Med*. 2015;372(23):2185-2196.
doi:10.1056/NEJMoa1503326
47. Carteaux G, Millán-Guilarte T, De Prost N, et al. Failure of Noninvasive Ventilation for De Novo Acute Hypoxemic Respiratory Failure: Role of Tidal Volume. *Crit Care Med*. 2016;44(2):282-290.
doi:10.1097/CCM.0000000000001379
48. Yoshida T, Grieco DL, Brochard L, Fujino Y. Patient self-inflicted lung injury and positive end-expiratory pressure for safe spontaneous breathing. *Curr Opin Crit Care*. 2020;26(1):59-65. doi:10.1097/MCC.0000000000000691
49. Rochwerg B, Brochard L, Elliott MW, et al. Official ERS/ATS clinical practice guidelines: noninvasive ventilation for acute respiratory failure. *Eur Respir J*.

2017;50(2):1602426. doi:10.1183/13993003.02426-2016

50. Hofmann W, Koblinger L, Martonen TB. Structural differences between human and rat lungs: implications for Monte Carlo modeling of aerosol deposition. *Health Phys.* 1989;57 Suppl 1:41-47. doi:10.1097/00004032-198907001-00005
51. Johnson JL, Moore EE, Hiester AA, Tamura DY, Zallen G, Silliman CC. Disparities in the respiratory burst between human and rat neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1999;65(2):211-216. doi:10.1002/jlb.65.2.211
52. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;44(5):725-738. doi:10.1165/rcmb.2009-0210ST
53. Kulkarni HS, Lee JS, Bastarache JA, et al. Update on the Features and Measurements of Experimental Acute Lung Injury in Animals: An Official American Thoracic Society Workshop Report. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2022;66(2):e1-e14. doi:10.1165/rcmb.2021-0531ST
54. Sadowitz B, Roy S, Gatto LA, Habashi N, Nieman G. Lung injury induced by sepsis: lessons learned from large animal models and future directions for treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(12):1169-1178. doi:10.1586/eri.11.141
55. Alm AS, Li K, Chen H, Wang D, Andersson R, Wang X. Variation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in eight strains of mice. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;171(2):157-164. doi:10.1016/j.resp.2010.02.009
56. Kabir K, Gelinas JP, Chen M, et al. Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. *Shock.* 2002;17(4):300-303. doi:10.1097/00024382-200204000-00010

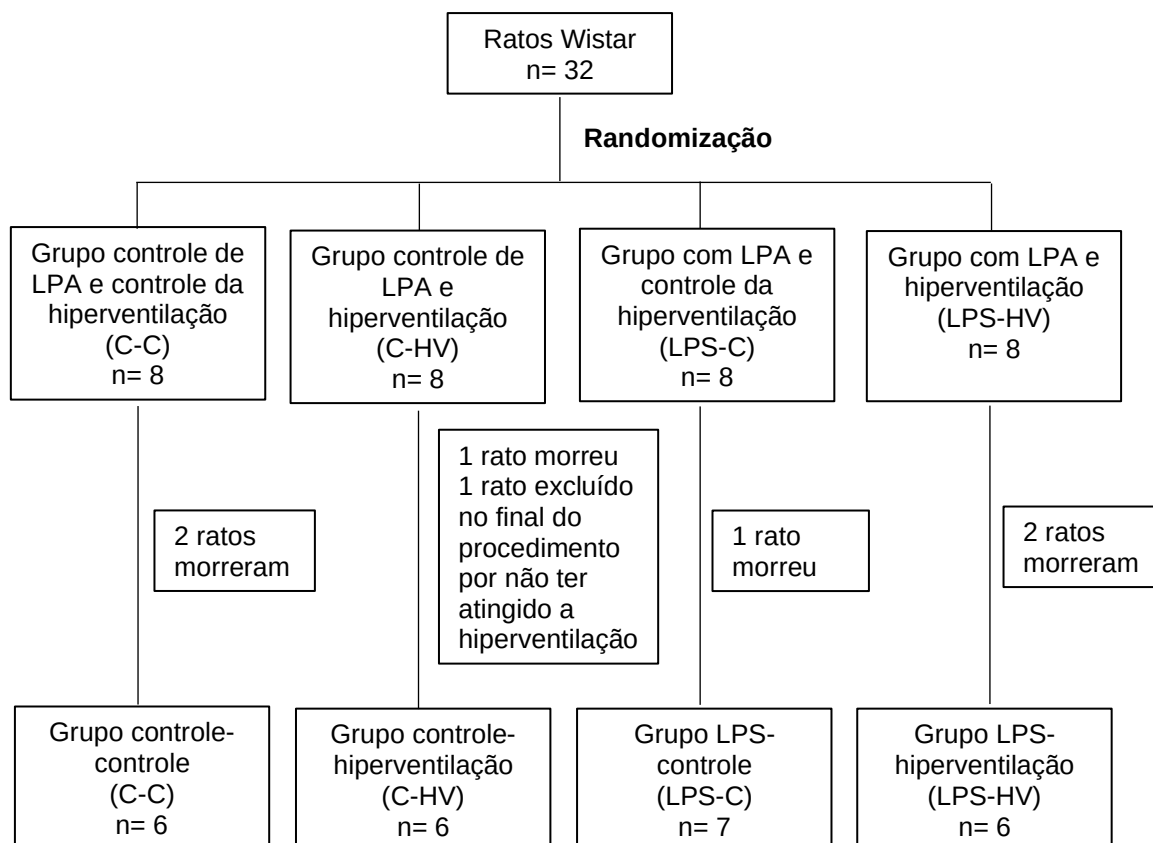
57. Rojas M, Woods CR, Mora AL, Xu J, Brigham KL. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(2):L333-L341. doi:10.1152/ajplung.00334.2004
58. He Z, Zhu Y, Jiang H. Inhibiting toll-like receptor 4 signaling ameliorates pulmonary fibrosis during acute lung injury induced by lipopolysaccharide: an experimental study. *Respir Res*. 2009;10(1):126. doi:10.1186/1465-9921-10-126
59. Morris CG, Low J. Metabolic acidosis in the critically ill: part 1. Classification and pathophysiology. *Anaesthesia*. 2008;63(3):294-301. doi:10.1111/j.1365-2044.2007.05370.x
60. Kiwull-Schöne H, Kiwull P, Manz F, Kalhoff H. Food composition and acid-base balance: alimentary alkali depletion and acid load in herbivores. *J Nutr*. 2008;138(2):431S-434S. doi:10.1093/jn/138.2.431S
61. Beck FX, Schramm M, Dörge A, Rick R, Thureau K. Effect of acute metabolic acidosis on transmembrane electrolyte gradients in individual renal tubule cells. *Pflügers Arch*. 1988;412(4):427-433. doi:10.1007/BF01907563
62. Iwabuchi S, Suzuki K, Abe I, Asano R. Comparison of the effects of isotonic and hypertonic sodium bicarbonate solutions on acidemic calves experimentally induced by ammonium chloride administration. *J Vet Med Sci*. 2003;65(12):1369-1371. doi:10.1292/jvms.65.1369
63. Celotto AC, Ferreira LG, Capellini VK, Albuquerque AA, Rodrigues AJ, Evora PR. Acute but not chronic metabolic acidosis potentiates the acetylcholine-induced reduction in blood pressure: an endothelium-dependent effect. *Braz J Med Biol Res*. 2016;49(2):e5007. doi:10.1590/1414-431X20155007
64. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA TEICNDCDEA– C. Diretriz brasileira para o cuidado

e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA. Brasília; 2013.

65. Lichtenstein A, Milani R Jr, Fernezlian SM, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA. Acute lung injury in two experimental models of acute pancreatitis: infusion of saline or sodium taurocholate into the pancreatic duct. *Crit Care Med*. 2000;28(5):1497-1502. doi:10.1097/00003246-200005000-00040
66. Sergio LPS, Lucinda LMF, Reboredo MM, et al. Emphysema induced by elastase alters the mRNA relative levels from DNA repair genes in acute lung injury in response to sepsis induced by lipopolysaccharide administration in Wistar rats. *Exp Lung Res*. 2018;44(2):79-88. doi:10.1080/01902148.2017.1422158
67. Fazza TF, Pinheiro BV, da Fonseca LMC, et al. Effect of low-level laser therapy on the inflammatory response in an experimental model of ventilator-induced lung injury. *Photochem Photobiol Sci*. 2020;19(10):1356-1363. doi:10.1039/d0pp00053a
68. da Fonseca LM, Reboredo MM, Lucinda LM, et al. Emphysema induced by elastase enhances acute inflammatory pulmonary response to intraperitoneal LPS in rats. *Int J Exp Pathol*. 2016;97(6):430-437. doi:10.1111/iep.12214
69. Rabelo MAE, Lucinda LMF, Reboredo MM, et al. Acute lung injury in response to intratracheal instillation of lipopolysaccharide in an animal model of emphysema induced by elastase. *Inflammation*. 2018;41(1):174-182. doi:10.1007/s10753-017-0675-5

10. APÊNDICES

Apêndice A: Distribuição dos animais entre os grupos experimentais



Apêndice B: Artigo original

Hyperventilation worsens inflammatory lung injury in rats ventilating spontaneously

Juliana D N Ferreira, MD^{a,b}

Maycon M Reboredo, PhD^{a,b}

Eduardo L V Costa, PhD^{c,d}

Lídia M C Fonseca, MSc^{a,b}

Jaime Retamal, PhD^e

Fabício J M Santos, MD^a

Gabriel P S Mota, MD^a

Flavia de Paoli, PhD^f

Adenilson S da Fonseca, PhD^g

Leda M F Lucinda, PhD^{a,f}

Bruno V Pinheiro, PhD^{a,b}

a. Pulmonary and Critical Care Division, University Hospital of Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

b. School of Medicine, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

c. Pulmonary Division, Heart Institute (Incor), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

d. Research and Education Institute, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil

e. School of Medicine, Pontifical Catholic University of Chile, Santiago, Chile

f. Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

g. Department of Biophysics and Biometry, Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding author: Bruno V Pinheiro, Av. Eugênio do Nascimento - s/nº, Dom Bosco, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36038-330, Brazil - bvallepinheiro@gmail.com

Funding: This study was supported by a National Council for Scientific and Technological Development – CNPq.

Conflicts of interest: none.

Key words: acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, spontaneous breathing, hyperventilation, lung injury

ABSTRACT

Objective: We investigated the effects of hyperventilation in acute lung injury in rats breathing spontaneously.

Design: Prospective, randomized, animal study.

Setting: University animal research laboratory.

Subjects: Thirty-two Wistar rats.

Interventions: Wistar rats were randomized to four groups to receive intraperitoneal LPS or saline, each combined, after 24 hours, with intravenous 5M NH_4Cl throughout 180 minutes (to induce metabolic acidosis and hyperventilation) or saline. Four groups were established: control-control (C-C), control-hyperventilation (C-HV), LPS-control (LPS-C), and LPS-hyperventilation (LPS-HV).

Measurements and Results: Venous blood gases were collected before and after venous infusion and analyzed to confirm the occurrence of metabolic acidosis and hyperventilation. After animal euthanasia, the lung injury was evaluated by the acute lung injury score (ALIs), morphometric quantification of perivascular edema, number of neutrophils in the bronchoalveolar lavage, mRNA expressions of biological markers in the lung tissue. Hyperventilation induced inflammatory lung injury in previously normal lungs and worsened the injury previously induced by LPS (ALIs: C-C=0.14 [IQR 0.12; 0.14]; C-HV=0.36 [IQR 0.31; 0.37]; LPS-C=0.51 [IQR 0.50; 0.54]; LPS-HV=0.58 [IQR 0.56; 0.62]; $p<0.01$). Perivascular edema, neutrophil counting in the bronchoalveolar lavage, and mRNA expression of amphiregulin were higher in the LPS-HV group.

Conclusions: Hyperventilation increased the inflammatory injury in rats with

acute lung injury during spontaneous ventilation. These results suggest that we should continue to study the role of vigorous spontaneous efforts in worsening inflammatory lung injury.

KEY POINTS

Question: Does hyperventilation increase inflammatory injury in rats with acute lung injury during spontaneous ventilation?

Findings: Prospective, randomized, animal study. Hyperventilation induced inflammatory lung injury in previously normal lungs and worsened the injury previously induced by LPS. Perivascular edema, neutrophil counting in the bronchoalveolar lavage, and mRNA expression of amphiregulin were higher in the LPS-hyperventilation group.

Meaning: Hyperventilation increased the inflammatory injury in rats with acute lung injury during spontaneous ventilation.

INTRODUCTION

Mechanical ventilation (MV) is essential for the treatment of many patients with severe forms of acute lung injury (ALI) (1). However, the inflation of the lungs with controlled positive pressure ventilation is heterogenous, with a greater expansion of the ventral regions compared to the dorsal ones. This ventilatory pattern worsens the ventilation to perfusion (V/Q) matching and, consequently, impairs pulmonary gas-exchange efficiency (2). Moreover, MV might result in a heterogeneous distribution of transpulmonary distending pressures, which increases the risk of ventilator-induced lung injury (VILI) (3).

An option to minimize those deleterious effects is to allow spontaneous effort during MV, which has been recognized to increase lung aeration and to improve V/Q and oxygenation in experimental and clinical studies (4). Other potential benefits include improving hemodynamic performance, avoiding diaphragmatic atrophy, improving patient comfort, reducing the need for aggressive sedation and/or paralysis (5).

Conversely, in the last years, evidence has shown that spontaneous effort might contribute to lung injury, especially in already severely injured lungs or when spontaneous efforts are vigorous. These efforts reduce pleural pressure (P_{pl}), increasing transpulmonary pressure and tidal volume (V_T), two factors that are associated with lung injury (6,7). In severely injured lungs with a heterogeneous distribution of aeration, spontaneous effort can also increase local lung stress, leading to lung injury even with low V_T (8). Moreover, negative P_{pl} increases transmural vascular pressure (the difference between intravascular and extravascular pressure), which favors fluid leakage to the pulmonary interstitium and alveolar space (9). This effort-dependent lung injury has been

termed patient self-inflicted lung injury (P-SILI) (10).

During the COVID-19 pandemic, the P-SILI concept was expanded to patients without mechanical ventilatory support. Some authors postulated that strong spontaneous inspiratory efforts might deteriorate lung injury and edema by increasing tissue stresses and pulmonary transvascular pressures. These authors suggested early intubation and effective sedation, with or without paralysis, to interrupt this cycle (11). However, it is not yet known to what extent inspiratory efforts are capable of aggravating lung injury and whether the possible benefits of early intubation outweigh the risks inherent to invasive MV. Based on this lack of robust evidence, some authors have questioned early intubation in preference to noninvasive strategies in patients with acute hypoxemic respiratory failure, suggesting that liberal indication of intubation and MV may increase mortality in these patients (12).

In this study, we used an established model of ALI induced by lipopolysaccharyde (LPS), and analyzed if the hyperventilation induced by metabolic acidosis increased the lung injury in rats during spontaneous ventilation.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Wistar rats weighing 280-360 g were obtained from the Reproduction Biology Center, Federal University of Juiz de Fora vivarium (Minas Gerais, Brazil). The study was approved by the Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Juiz de Fora (Protocol number: 017/2022).

Experimental Protocol

Initially, the rats were randomly assigned to two main groups: LPS and control. In the LPS-group, the animals received 5 mg/Kg of LPS (LPS serotype 055:B5, Sigma-Aldrich, Israel) intraperitoneally, dissolved in 0.5 ml of 0.9% saline solution. In the control group, the animals received, intraperitoneally, an equivalent amount of 0.9% saline solution.

After 24 h, the rats were anesthetized with an intraperitoneal bolus of xylazine (8 mg/kg), midazolam (5 mg/kg), and ketamine (80 mg/kg). A polyethylene catheter was inserted into the left jugular vein for infusion of solutions and to obtain blood samples for venous blood gas analysis (ABL90 FLEX; Radiometer, Copenhagen, Denmark).

The rats of LPS and control groups were subsequently randomized to two groups, hyperventilation or control, resulting in four groups: control-control group (C-C); control-hyperventilation group (C-HV); LPS-control group (LPS-C); LPS-hyperventilation group (LPS-HV) (Figure 1). The animals randomized to the hyperventilation groups (C-HV and LPS-HV) received intravenous infusion of 1 ml/kg of ammonium chloride (5M-NH₄Cl, – Pharmacology Laboratory – School of Pharmacy - Federal University of Juiz de Fora, Brazil) dissolved in 0.9% saline to complete 3.5 ml, over 180 minutes. The animals randomized to the control groups (C-C and LPS-C) received venous infusion of the same volume of 0.9% saline solution, over 180 minutes. To assess whether there was success in inducing metabolic acidosis (HCO₃⁻ lower or equal than 15 mEq/L) and hyperventilation (reduction in the PvCO₂ equal or greater than 25%, compared to baseline), a venous blood sample was collected for gas analysis immediately after the end of

the infusion.

After infusion of NH_4Cl or saline, a tracheostomy was performed, and the trachea was cannulated with a 14-gauge tube. The rats were mechanically ventilated (Inspira ASV, Harvard Apparatus, USA) for one minute, with the following parameters: volume-controlled mode, V_T of 6 ml/Kg, respiratory rate (RR) of 80 breaths/min, inspiratory to expiratory ratio of 1:2, FIO_2 of 21% and PEEP of 5 cm H_2O .

Thereafter, laparotomy was performed, and the animals were euthanized by exsanguination through section of the abdominal aorta. The trachea was clamped at end-inspiration and the lungs were removed for further analysis.

Lung histology

The lungs were removed in blocks and the right caudal lobes were fixed in 10% buffered formaldehyde. After embedding in paraffin, four-micrometer-thick slices were cut and stained with hematoxylin-eosin. Morphological examinations were performed by a pathologist blinded to experimental details, with a light microscope (Zeiss, Hallbergmoos, Germany). ALI was assessed using the American Thoracic Society recommended ALI score (ALIs) (13). Briefly, 20 random fields filled with pulmonary alveoli were evaluated at a magnification of 400-x and were independently scored. Values of zero, one or two were used to represent the injury severity based on the following findings: neutrophils in the alveolar space, neutrophils in the interstitial space, hyaline membranes, proteinaceous debris filling the airspaces, and alveolar septal thickening. To generate the ALIs, the sum of the five variables was weighted according to the relevance ascribed to each one. The resulting score was a continuous value

between zero (normal) and one (the most severe injury).

Perivascular edema was quantified by morphometric analysis using the point-counting technique, as previously described (14,15). At a magnification of 400-x, we analyzed 10 randomly selected fields per lung and evaluated the transversely sectioned intraparenchymatous arteries and veins. We computed the number of points falling in areas of perivascular edema (PE) and the number of points falling in areas of the vessels (V). The perivascular edema index was calculated as the ratio PE/V. The final perivascular index was the mean of the 10 analyzed fields. All measures were performed in a blinded way (14,15).

Clara cell secretory protein-16 (CC16), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and Amphiregulin expressions

The right cranial lobes were crushed and transferred to microcentrifuge flex tubes with Trizol® reagent to total RNA extraction by standard procedure. RNA concentration and purity were determined on a spectrophotometer. cDNA synthesis was carried out using a two-step cDNA synthesis kit (Promega, USA). One microgram of RNA was reverse transcribed into cDNA using GoScript™ reverse transcriptase (Promega, USA) according to manufacturer's protocol using a total reaction of 20 µl. Real time quantitative polynucleotide chain reaction (RT-qPCR) was performed using 5 µl of SybrGreen concentrate for a final volume of 10 µl containing 50 ng of cDNA. For determination of the initial relative quantity of cDNA, samples were amplified with ICAM-1, CC16, and amphiregulin primers. Reactions were run on an Applied Biosystems 7500 RT-qPCR machine (Applied Biosystems, USA). An internal standard was set up to normalize the relative gene expression level, and this standard was run with each different experiment. Melt

curves analyses were performed for all genes and the specificity as well as integrity of the PCR products were confirmed by the presence of a single peak. Relative expression was calculated from the differences in cycle time of an internal standard (GAPDH) compared to the target mRNA. Duplicate CT values were analyzed in Microsoft Excel (Microsoft) using the comparative CT method (Applied Biosystems, USA) (16).

Bronchoalveolar lavage (BAL)

BAL was performed in the left lung by instillation and slow aspiration of 4 ml of phosphate-buffered saline solution containing ethylenediamine tetraacetic acid (10 nM). This procedure was repeated three times. The collected fluid was centrifuged at 1500 g-force for 10 min to separate the cellular from the non-cellular elements. Total leucocyte numbers were measured in a Neubauer chamber under light microscopy after diluting the samples in Turk solution (2% acetic acid). The cell pellet was resuspended in phosphate-buffered saline and stained with May–Grunwald–Giemsa for differential cell counts, which were performed with a minimum of 300 cells.

Statistical analysis

Data were expressed as median and interquartile range. Normality of data was analyzed by the Shapiro-Wilk test. One-way ANOVA was used to compare normally distributed data among groups. In the post hoc analysis to separate differences between the means, when a significant *F* ratio was obtained for a factor or for the interactions of factors, we used Tukey's pairwise multiple comparison test. For the non-normally distributed data, the Kruskal-Wallis test

followed by the Mann-Whitney U test was used. Adjustments for multiple measures were performed according to the Bonferroni correction. All tests were two-tailed and a p-value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS version 17.0.

RESULTS

We used 32 rats to build the four groups. Six rats died during the experiment period, two from the C-C group, one from the C-HV group, one from the LPS-C group, and two from the LPS-HV group. One rat from the C-HV group was excluded because, at the end of the experiment hyperventilation was not achieved (Figure 1).

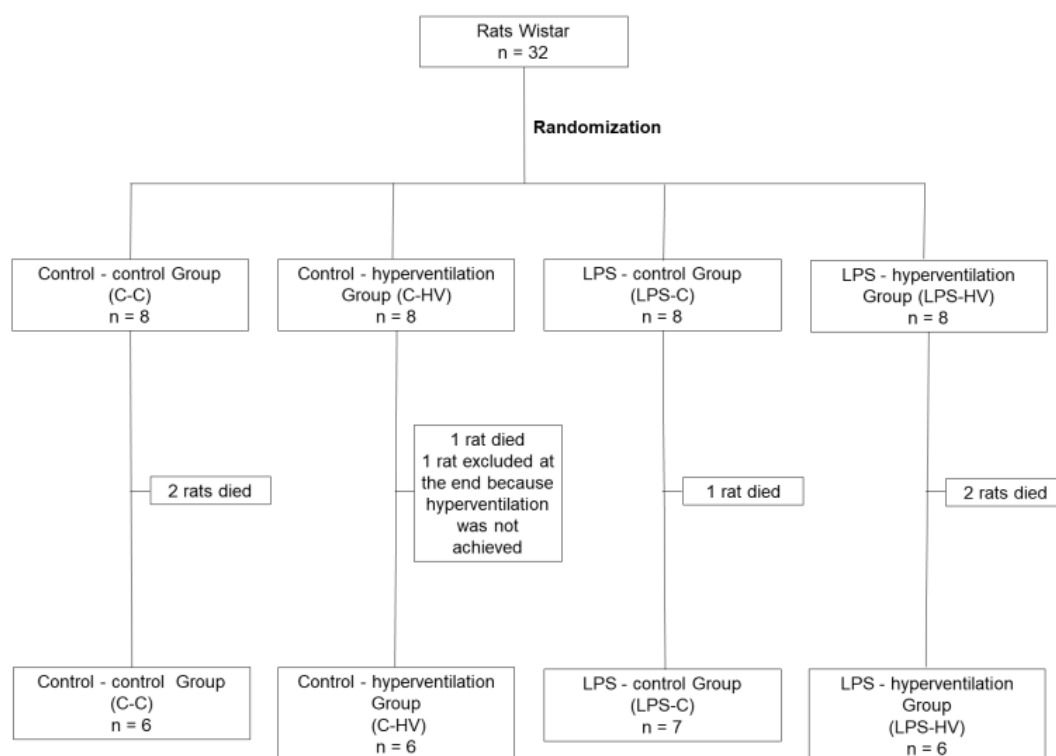


Figure 1. Rats included in the analyses.

Hyperventilation induction

NH₄Cl infusion induced metabolic acidosis, as demonstrated by significantly lower levels of HCO₃⁻ in animals of the C-H and LPS-H groups, at the end of the experiment compared with baseline. The metabolic acidosis resulted in hyperventilation in these groups, evidenced by the reduction in PvCO₂ after NH₄Cl infusion compared with baseline. The animals of the groups without hyperventilation did not present significant differences in HCO₃⁻ and PvCO₂ between baseline and the end of the experiment (Table 1).

Table 1. Venous blood gas parameters at baseline and at the end of the experiment

	Group C-C (N = 6)	Group C-HV (N = 6)	Group LPS-C (N = 7)	Group LPS-HV (N = 6)
PvCO ₂ (mmHg)				
Baseline	46 (41-47)	43 (42-48)	30 (28-30)* ^{&}	35 (32-38)
Final	57 (40-58)	29 (28-30)* [#]	30 (27-33)*	26 (26-30)* [#]
DPvCO ₂	+12 (-7 +19)	-14 (-19 -14)	+2 (-3 +3)	-8 (-9 -7)
pH				
Baseline	7.35 (7.33-7.38)	7.38 (7.37-7.38)	7.42 (7.37-7.42)	7.32 (7.32-7.33) [†]
Final	7.28 (7.19-7.33)	7.33 (7.32-7.33)	7.38 (7.36-7.38)	7.22 (7.16-7.25) [†]
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)				
Baseline	23 (23-24)	25 (25-28)	18 (16-20) ^{&}	19 (14-19) ^{&}
Final	21 (18-22)	15 (14-15)* [#]	17 (15-18)	14 (11-14)* ^{†#}

C-C: control-control group; C-HV: control-hyperventilation group; LPS-C: lipopolysaccharyde-control group; LPS-HV: lipopolysaccharyde-hyperventilation group.

HCO₃⁻: bicarbonate; PvO₂: venous carbon dioxide partial pressure; D: difference between final and baseline values.

Data expressed as median and interquartile range (25% and 75%)

* p < 0.05 when compared to C-C; [&] p < 0.05 when compared to C-HV;

[†] p < 0.05 when compared to LPS-C; [#] final compared to baseline.

Comparisons by Tukey's pairwise multiple comparison test, with Bonferroni correction.

Lung histology

Rats that received LPS (LPS-C and LPS-HV groups) showed a higher ALI score compared with the C-C group. The analysis of each component of the score demonstrated that the LPS-C and LPS-HV groups, compared with the C-C, had greater alveolar and interstitial neutrophil infiltration, as well as greater amount of alveolar proteinaceous debris. Among the rats that received LPS, the ALI score was higher in the LPS-HV group. This difference in the ALI score was due to a greater alveolar and interstitial neutrophil infiltration in the LPS-HV group compared with the LPS-C group. Rats from the C-HV showed a higher ALI score compared with the C-C group, with greater alveolar and interstitial neutrophil infiltration (Table 2, Figure 2). The morphometric analysis showed higher perivascular edema in the LPS-HV compared with the C-C group (Figure 2).

Table 2. Acute lung injury score and its components

	Groups			
	C-C (N = 6)	C-HV (N = 6)	LPS-C (N = 7)	LPS-HV (N = 6)
ALIs	0.14 (0.12-0.14)	0.36 (0.31-0.37)*	0.51 (0.50-0.54)* Δ	0.58 (0.56-0.62)* Δ $\dagger$
Alveolar neutrophils	0.0 (0.0-1.0)	18.0 (11.8-19.3)*	44.0 (42.0-46.0)* Δ	58.5 (54.0-61.8)* Δ $\dagger$
Interstitial neutrophils	35.0 (32.8-38.0)	75.0 (69.0-76.3)*	78.0 (77.0-79.0)* Δ	80.0 (79.0-80.0)* Δ
Proteinaceous debris	2.0 (0.0-4.5)	5.5 (2.8-7.0)	10.0 (8.0-30.0)*	7.5 (3.5-19.0)
Septal thickening	0.0 (0.0-0.5)	4.0 (0.0-5.5)	2.0 (0.0-2.0)	0.5 (0.0-6.3)

ALIs: acute lung injury score; C-C: control-control group; C-HV: control-hyperventilation group; LPS-C: lipopolysaccharyde-control group; LPS-HV: lipopolysaccharyde-hyperventilation group. Data expressed as median and interquartile range (25% and 75%)

* $p < 0.05$ when compared to C-C; $\Delta p < 0.05$ when compared to C-HV; $\dagger p < 0.05$ when compared to LPS-C. Comparisons by Tukey's pairwise multiple comparison test, with Bonferroni correction.

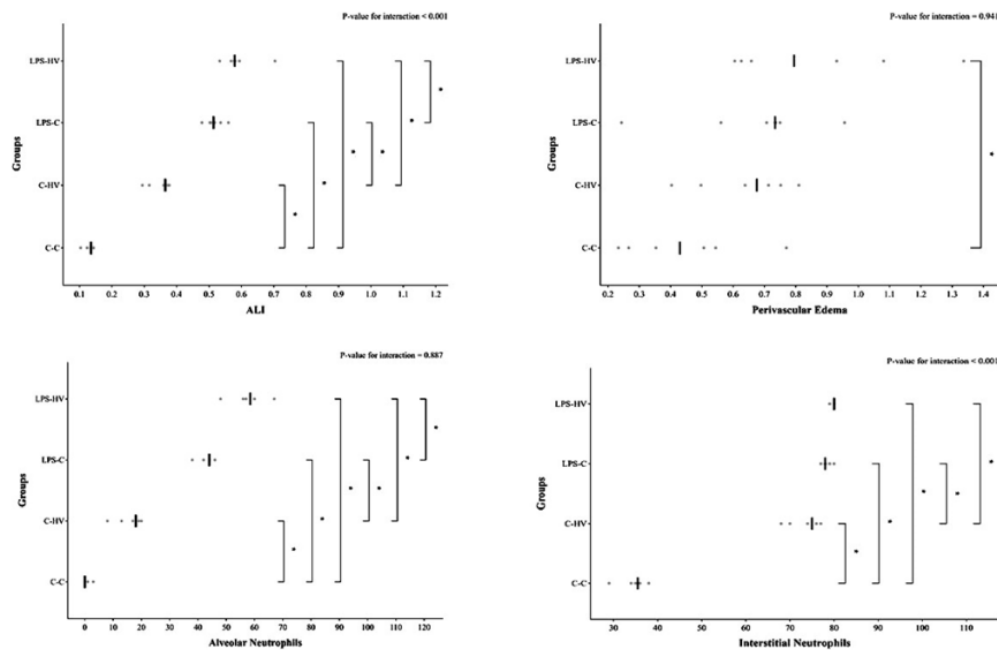


Figure 2. Acute lung injury score, perivascular edema, alveolar neutrophils, and interstitial neutrophils

ALIs: acute lung injury score; C-C: control-control group; C-HV: control-hyperventilation group; LPS-C: lipopolysaccharyde-control group; LPS-HV: lipopolysaccharyde-hyperventilation group. Each symbol represents individual animals and black lines represent median values of each group.

* $p < 0.05$ - Comparisons by Tukey's pairwise multiple comparison test, with Bonferroni correction.

Bronchoalveolar lavage

Intraperitoneal LPS injection followed by hyperventilation increased the BAL cellularity, as demonstrated by the greater number of neutrophils in the LPS-HV group compared with the C-C and C-HV groups (Figure 3).

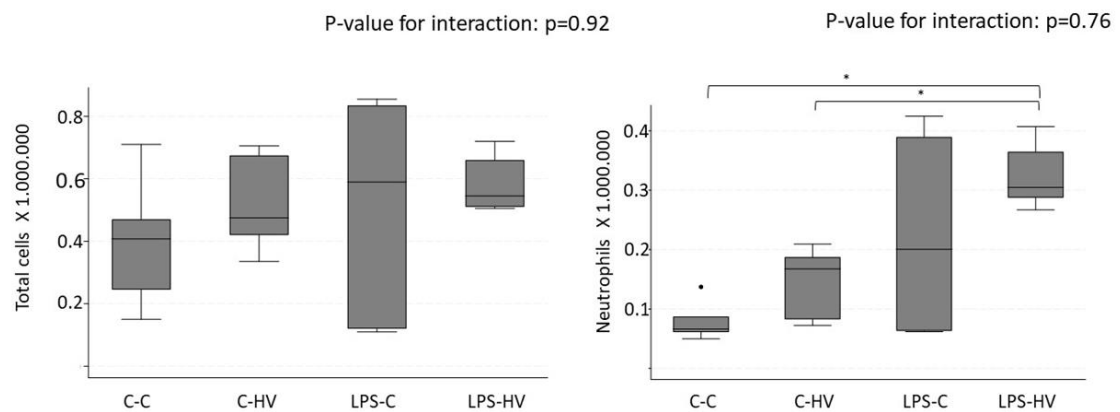


Figure 3. Cell count in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid.

C-C: control-control group; C-HV: control-hyperventilation group; LPS-C: lipopolysaccharyde-control group; LPS-HV: lipopolysaccharyde-hyperventilation group.

* $p < 0.05$ – Comparisons by Tukey's pairwise multiple comparison test, with Bonferroni correction.

ICAM 1, CC16, and amphiregulin mRNA expressions

mRNA relative levels of biological markers associated with inflammation (ICAM-1), pulmonary stretch (amphiregulin), and epithelial cell damage (CC-16) are shown in Figure 4. mRNA relative expression of amphiregulin was higher in the LPS-HV group compared with the others (Figure 4).

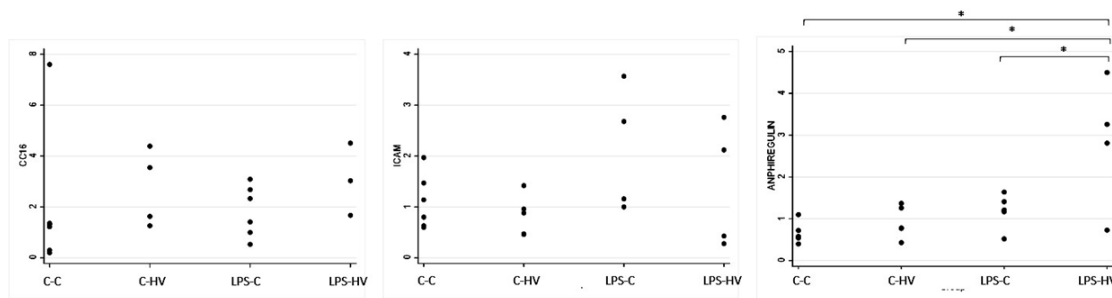


Figure 4. mRNA relative levels of clara cell secretory protein-16 (CC16), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), and amphiregulin mRNA expressions in lung tissue. GAPDH was used as internal standard for normalization.

C-C: control-control group; C-HV: control-hyperventilation group; LPS-C: lipopolysaccharyde-control group; LPS-HV: lipopolysaccharyde-hyperventilation group.

* $p < 0.05$ – Comparisons by Mann-Whitney U test, with Bonferroni correction.

DISCUSSION

In our study, intraperitoneal injection of LPS led to inflammatory ALI, as shown by higher ALIs, with greater alveolar and interstitial neutrophil infiltration in these animals compared with the controls. The addition of hyperventilation induced by NH_4Cl infusion increased the inflammatory lung injury, as shown by higher ALIs, higher perivascular edema, greater number of neutrophils in the BAL, and higher mRNA expressions of amphiregulin.

Intraperitoneal injection of LPS is a stablished experimental model of ALI, characterized by changes in histology (interstitial thickening, alveolar and interstitial neutrophil infiltration, presence of proteinaceous debris in the alveolar spaces), lung mechanics (increased elastance of the respiratory system), and alveolar-capillary barrier (increase in lung wet/dry weight ratio, increase in albumin concentration in BAL fluid) (17). Usually, ALI induced by LPS results in

mild impairments in gas exchange, including hypoxemia levels that can be managed without MV (18). This latter characteristic played a decisive role in our selection of the injury model, aligning with our aim to investigate the role of P-SILI during spontaneous, unassisted breathing.

To induce hyperventilation, we applied a model of metabolic acidosis by intravenous infusion of NH_4Cl . NH_4Cl is converted to H^+ and urea in the liver and reduces renal HCO_3^- reabsorption. This model was described by Iwabushi et al. and induces metabolic acidosis and compensatory hyperventilation during the infusion period (19). Confirming the model efficacy, the rats that received NH_4Cl presented lower levels of PvCO_2 at the end of the experiments, compared with baseline levels.

We demonstrated that hyperventilation increased the inflammatory lung injury induced by the intraperitoneal injection of LPS, as shown by higher neutrophil infiltration in alveolar spaces in the histological analysis and higher neutrophil count in the BAL. We also showed a higher expression of mRNA of amphiregulin, a member of the epidermal growth factor family, that is upregulated in conditions of lung epithelial cell damage, as occurs in VILI (19). Previous experimental studies have demonstrated that vigorous inspiratory efforts during mechanically assisted breathing may cause or worsen lung injury. Yoshida et al. showed, in an experimental model of ALI by repeated lung lavage, that vigorous spontaneous efforts cause lung injury, even with plateau pressure limited to <30 cm H_2O (20). Vigorous spontaneous efforts increase transpulmonary pressure, which is the total alveolar stretching pressure, resulting in higher tidal volume. Both higher transpulmonary pressure and higher tidal volume are associated with VILI, which can be potentiated by high respiratory frequency (20). Moreover, in

heterogenous lungs, as seen in the acute respiratory distress syndrome, spontaneous efforts exert their impacts differently in different regions, with higher swings in pleural pressure in dependent regions, as compared with nondependent regions. This phenomenon, called pendelluft, results in higher local transpulmonary pressure and higher tidal inflation on dependent regions, and might increase the risk of VILI (7).

Spontaneous efforts also increase transmural vascular pressure by generating more negative pleural pressures thus contributing to pulmonary edema (21). In accordance with this theory, we demonstrated that rats with inflammatory ALI in whom hyperventilation was induced by NH_4Cl presented higher perivascular edema index compared to the C-C group.

Differently from these studies, our model studied the impact of spontaneous efforts on ALI in extubated animals, a subject on which knowledge is limited. Positive pressure ventilation can modify the effect of spontaneous efforts on the lung in many different ways. For example, the use of positive end-expiratory pressure decreases pendelluft and promotes neuromechanical uncoupling of the diaphragm, both of which attenuate injury (22). Furthermore, the use of positive pressure ventilation also affects the transvascular pressure regimes adding another layer of impact. However, we were not the first to study the impact of spontaneous breathing in extubated subjects. Mascheroni et al. observed that severe hyperventilation in spontaneous breathing led to pulmonary dysfunction in an experimental ovine model with previously normal lungs (23). We expanded their findings by studying in a factorial design the impact of hyperventilation on normal lungs and on lungs previously injured by LPS injection (23). This experimental design allowed us to better represent clinical scenarios in which

lung injury due to spontaneous efforts may occur and to determine whether the injurious effects of spontaneous efforts depend on the underlying lung condition. Our findings suggest that allowing vigorous spontaneous efforts can induce inflammatory injury in previously normal lungs and can aggravate a pre-existent inflammatory lung injury.

Our results cannot be immediately extrapolated to clinical practice. However, they corroborate with data obtained from experimental studies in large animals (all conducted during MV) and with the physiological basis of lung injury due to spontaneous effort. However, the magnitude of this injury and its clinical impact on patients with ALI remain unclear. During the COVID-19 pandemic, some authors advocated the use of noninvasive support (e.g. high-flow nasal oxygen, CPAP, or Bi-PAP) to avoid excessive inspiratory efforts in mild forms of acute respiratory failure (24). The same authors indicated early intubation, followed by effective sedation, for more severe forms of acute respiratory failure or for patients who did not improve their respiratory pattern with noninvasive support (11). The rationale for these recommendations was the risk of progressive deterioration of the lung function (a VILI vortex), induced by patients' inspiratory efforts (11,24). These recommendations were refused by other investigators, since no clinical study has been performed yet to prove that vigorous inspiratory efforts cause clinically significant lung injury (12). Moreover, if lung injury due to inspiratory efforts in this context exists, clinicians should balance its risks with the risks of invasive MV to take the best decision.

Our study has some limitations. First, the intraperitoneal LPS injection-induced ALI model resulted in metabolic acidosis. Thus, even before NH_4Cl infusion, the two groups that received LPS already presented acidosis and

hyperventilation. Although NH_4Cl infusion intensified the acidosis and hyperventilation in the LPS-HV group, its difference compared with the LPS-C group was reduced. This smaller difference between the two groups may have compromised the detection of hyperventilation injury in LPS-injured lungs. Second, our model was conducted in small animals (Wistar rats), in which regional differences in pleural pressure may not be as significant as in larger animals and humans. Since regional differences in pleural pressure may play an important role in the lung injury induced by inspiratory efforts, our model might have underestimated the negative impact of hyperventilation in previously injured lungs. Third, we cannot rule out a possible direct effect of NH_4Cl on lung injury or systemic inflammation, since it has not been addressed in previous experimental studies. Fourth, the mRNA expressions of the biological markers were not performed in all animals. This small sample size reduced the statistical power to identify difference among the groups.

CONCLUSIONS

In conclusion, our results showed that hyperventilation increased the inflammatory injury in rats with ALI during spontaneous ventilation. These results suggest that we should continue to study the role of vigorous spontaneous efforts in worsening inflammatory lung injury.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Reproductive Biology Center and School of Pharmacy of the Federal University of Juiz de Fora for allowing this study to be carried out.

REFERENCES

1. Gorman EA, O'Kane CM, McAuley DF: Acute respiratory distress syndrome in adults: diagnosis, outcomes, long-term sequelae, and management. *Lancet* 2022; 400:1157-1170
2. Putensen C, Hering R, Wrigge H: Controlled versus assisted mechanical ventilation. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8:51-57
3. Slutsky AS, Ranieri VM: Ventilator-induced lung injury. *N Engl J Med* 2013; 369:2126-2136
4. Wrigge H, Zinserling J, Neumann P, et al: Spontaneous breathing improves lung aeration in oleic acid-induced lung injury. *Anesthesiology* 2003; 99:376-384
5. Yoshida T, Amato MBP, Kavanagh BP, et al: Impact of spontaneous breathing during mechanical ventilation in acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2019; 25:192-198
6. Yoshida T, Uchiyama A, Matsuura N, et al: Spontaneous breathing during lung-protective ventilation in an experimental acute lung injury model: high transpulmonary pressure associated with strong spontaneous breathing effort may worsen lung injury. *Crit Care Med* 2012; 40:1578-1585
7. Yoshida T, Torsani V, Gomes S, et al: Spontaneous effort causes occult pendelluft during mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188:1420-1427
8. Yoshida T, Nakahashi S, Nakamura MAM, et al: Volume-controlled ventilation does not prevent injurious inflation during spontaneous effort. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 196:590-601
9. Kallet RH, Alonso JA, Luce JM, et al: Exacerbation of acute pulmonary edema

during assisted mechanical ventilation using a low-tidal volume, lung-protective ventilator strategy. *Chest* 1999; 116:1826-1832

10. Brochard L, Slutsky A, Pesenti A: Mechanical ventilation to minimize progression of lung injury in acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 195:438-442

11. Gattinoni L, Gattarello S, Steinberg I, et al: COVID-19 pneumonia: pathophysiology and management. *Eur Respir Rev* 2021; 30:210138

12. Tobin MJ, Laghi F, Jubran A: P-SILI is not justification for intubation of COVID-19 patients. *Ann Intensive Care* 2020; 10:105

13. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al: An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 44:725-738

14. Hizume DC, Rivero DH, Kasahara DI, et al: Effects of positive end-expiratory pressure in an experimental model of acute myocardial infarct in Wistar rats. *Shock* 2007; 27:584-589

15. Samano MN, Pazetti R, Prado CM, et al: Effects of pneumonectomy on nitric oxide synthase expression and perivascular edema in the remaining lung of rats. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42:1113-1118

16. Fazza TF, Pinheiro BV, da Fonseca LMC, et al: Effect of low-level laser therapy on the inflammatory response in an experimental model of ventilator-induced lung injury. *Photochem Photobiol Sci* 2020; 19:1356-1363

17. Bianchi AM, Reboredo MM, Lucinda LM, et al: The effects of prone position ventilation on experimental mild acute lung injury induced by intraperitoneal lipopolysaccharide injection in rats. *Lung* 2016; 194:193-199

18. Chimenti L, Morales-Quinteros L, Puig F, et al: Comparison of direct and

indirect models of early induced acute lung injury. *Intensive Care Med Exp* 2020; 8(Suppl 1):62

19. Iwabuchi S, Suzuki K, Abe I, et al: Comparison of the effects of isotonic and hypertonic sodium bicarbonate solutions on acidemic calves experimentally induced by ammonium chloride administration. *J Vet Med Sci* 2003; 65:1369-1371

20. Yoshida T, Uchiyama A, Matsuura N, et al: Spontaneous breathing during lung-protective ventilation in an experimental acute lung injury model: high transpulmonary pressure associated with strong spontaneous breathing effort may worsen lung injury. *Crit Care Med* 2012; 40:1578-1585

21. Moriondo A, Mukenge S, Negrini D: Transmural pressure in rat initial subpleural lymphatics during spontaneous or mechanical ventilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H263-H269

22. Morais CCA, Koyama Y, Yoshida T, et al: High positive end-expiratory pressure renders spontaneous effort noninjurious. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; 197:1285-1296

23. Mascheroni D, Kolobow T, Fumagalli R, et al: Acute respiratory failure following pharmacologically induced hyperventilation: an experimental animal study. *Intensive Care Med* 1988; 15:8-14

24. Marini JJ, Gattinoni L: Management of COVID-19 Respiratory Distress. *JAMA* 2020; 323:2329-2330

11. ANEXOS

Anexo A: Certificado da Comissão de ética em experimentação animal



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA HIPERVENTILAÇÃO SOBRE A LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM RATOS WISTAR", registrada com o nº 017/2022, sob a responsabilidade de **Maycon de Moura Reboredo, Bruno do Valle Pinheiro, Leda Marília Fonseca Lucinda, Lídia Maria Carneiro da Fonseca e Juliana Dias Nascimento Ferreira** que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFJF) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA-MG, em reunião de 03/05/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/07/2022 a 22/12/2023
Médico Veterinário responsável pela pesquisa	Ricardo Palhares Zschaber de Araújo
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> Wistar
Nº de animais	40
Peso/Idade	250-300 gramas / 3 meses
Sexo	Macho
Procedência dos animais	Centro de Biologia da Reprodução – CBR/UFJF
Local de manutenção dos animais	Centro de Biologia da Reprodução – CBR/UFJF



Documento assinado eletronicamente por **Ana Eliza Andreazzi, Professor(a)**, em 17/05/2022, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vera Maria Peters, Coordenador(a)**, em 17/05/2022, às 15:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0772547** e o código CRC **A26BCC5D**.

ANEXO B: Comprovante de submissão do artigo

The screenshot shows a web browser window with the URL `www2.cloud.editorialmanager.com/ccmed/default2.aspx`. The page is for 'Critical Care Medicine' and is logged in as 'Bruno Pinheiro'. The main menu includes 'Home', 'Main Menu', 'Submit a Manuscript', 'About', and 'Help'. The 'Help' dropdown menu is open, showing 'System Help' and 'Video Tutorials'. The page title is 'Submissions Being Processed for Author'. Below the title, it says 'Page: 1 of 1 (1 total submissions)' and 'Results per page: 10'. A table with 5 columns is displayed: 'Action', 'Manuscript Number', 'Title', 'Initial Date Submitted', and 'Status Date'. The table contains one row with the following data: 'Action Links', an empty 'Manuscript Number' cell, 'Hyperventilation worsens inflammatory lung injury in rats ventilating spontaneously', 'Nov 5 2023 8:59:12:693AM', and 'Nov 5 2023 8:59:15:173AM'. Below the table, it says 'Page: 1 of 1 (1 total submissions)' and 'Results per page: 10'.

Caixa de entrada (1,239) x 1 nova mensagem x (2) WhatsApp x Editorial Manager® x Google x + - x

www2.cloud.editorialmanager.com/ccmed/default2.aspx Atualizar

em Critical Care Medicine Bruno Pinheiro | Logout

Home Main Menu Submit a Manuscript About Help

System Help Video Tutorials

← Submissions Being Processed for Author

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Results per page: 10

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date
Action Links		Hyperventilation worsens inflammatory lung injury in rats ventilating spontaneously	Nov 5 2023 8:59:12:693AM	Nov 5 2023 8:59:15:173AM

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Results per page: 10



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

Nº PROPP: 710.5122023.35-M

Nº PPG: 24/2023

AValiação da Banca Examinadora

Tendo o(a) senhor(a) Presidente declarado aberta a sessão, mediante o prévio exame do referido trabalho por parte de cada membro da Banca, o(a) discente procedeu à apresentação de seu Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-graduação *Stricto sensu* e foi submetido(a) à arguição pela Banca Examinadora que, em seguida, deliberou sobre o seguinte resultado:

(X) APROVADO (Conceito A)

() APROVADO CONDICIONALMENTE (Conceito B), mediante o atendimento das alterações sugeridas pela Banca Examinadora, constantes do campo Observações desta Ata.

() REPROVADO (Conceito C), conforme parecer circunstanciado, registrado no campo Observações desta Ata e/ou em documento anexo, elaborado pela Banca Examinadora

Novo título da Dissertação/Tese (só preencher no caso de mudança de título):

Observações da Banca Examinadora caso:

- O discente for Aprovado Condicionalmente
- Necessidade de anotações gerais sobre a dissertação/tese e sobre a defesa, as quais a banca julgue pertinentes.

Banca de defesa realizada de forma não presencial de acordo com a Resolução nº 10/2022 CSPP e e nº 16/2023-CSPP com a Portaria 882/2022 da UFJF . Todos os membros e a discente participaram da sessão de Defesa e a acompanharam na sua integralidade.

Foi realizada uma retificação na composição da banca, sendo que a Profa. Leda Marília Fonseca Lucinda participou como coorientadora e o Prof. Maycon de Moura Reboredo como membro titular interno.

Nada mais havendo a tratar, o(a) senhor(a) Presidente declarou encerrada a sessão de Defesa, sendo a presente Ata lavrada e assinada pelos(as) senhores(as) membros da Banca Examinadora e pelo(a) discente, atestando ciência do que nela consta.

INFORMAÇÕES

- Para fazer jus ao título de mestre(a)/doutor(a), a versão final da dissertação/tese, considerada Aprovada, devidamente conferida pela Secretaria do Programa de Pós-graduação, deverá ser tramitada para a PROPP, em Processo de Homologação de Dissertação/Tese, dentro do prazo de 90 dias a partir da data da defesa. Após a entrega dos dois exemplares definitivos, o processo deverá receber homologação e, então, ser encaminhado à CDARA.
- Esta Ata de Defesa é um documento padronizado pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Observações excepcionais feitas pela Banca Examinadora poderão ser registradas no campo disponível acima ou em documento anexo, desde que assinadas pelo(a) Presidente(a).
- Esta Ata de Defesa somente poderá ser utilizada como comprovante de titulação se apresentada junto à Certidão da Coordenadoria de Assuntos e Registros Acadêmicos da UFJF (CDARA) atestando que o processo de confecção e registro do diploma está em andamento.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Leda Marília Fonseca Lucinda - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Maycon de Moura Reboredo

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Marcelo Britto Passos Amato

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Patricia Rieken Macedo Rocco

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Juliana Dias Nascimento Ferreira

Discente

Juiz de Fora, 09 / 11 / 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Dias Nascimento Ferreira, Professor(a)**, em 08/12/2023, às 13:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno do Valle Pinheiro, Professor(a)**, em 08/12/2023, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leda Marília Fonseca Lucinda, Professor(a)**, em 08/12/2023, às 15:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maycon de Moura Reboredo, Professor(a)**, em 08/12/2023, às 15:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Rieken Macedo Rocco, Usuário Externo**, em 14/12/2023, às 16:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1566916** e o código CRC **6CFA5334**.