VIVIEN SCHMELING PICCIN

**Efeitos da lesão pulmonar induzida pela
ventilação mecânica sobre o epitélio das vias
aéreas de condução e sua influência no aparelho
mucociliar : modelo experimental em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Elnara Márcia Negri

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Piccin, Vivien Schmeling

Efeitos da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica sobre o epitélio das vias aéreas de condução e sua influência no aparelho mucociliar : modelo experimental em coelhos / Vivien Schmeling Piccin. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Elnara Márcia Negri.

Descritores: 1.Depuração mucociliar 2.Muco 3.Cílios 4.Ventilação mecânica
5.Traumatismo pulmonar induzido por respirador 6.Mecanotransdução celular

USP/FM/SBD-026/10

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Roberto Buckhazi Piccin

Você é mais que especial. É meu parceiro, meu grande amor, meu melhor amigo. Sempre incentivou minhas idéias, me deu apoio e conselhos sábios. Minha admiração por você é enorme. O seu companheirismo é fundamental para minhas conquistas e estas somente têm significado porque tenho você ao meu lado. Eu te amo.

À minha filha Priscila Schmeling Piccin

Você é minha companheira de uma jornada que no início foi muito árdua e difícil. Apreendi com você, amadureci com você. Minha filha, eu te admiro muito, pela sua coragem, dedicação aos seus ideais, pelo seu coração bondoso. Obrigada pela sua compreensão e pelo seu carinho. Eu te amo.

À minha filha Andressa Schmeling Piccin

Meu “chicletinho”. Inteligente e amorosa. Sempre grudada na mamãe. Sempre ligando para me contar as novidades da escola ou para saber onde estou e a que horas vou chegar. Minha companheirinha de todos os momentos. Eu te amo.

À minha mãe Felicia Schmeling

Eu admiro sua coragem para sozinha criar três filhos, sua força em tantos momentos difíceis da vida, sua disciplina para voltar a estudar e se formar. Mãe, eu também me orgulho muito de você. Eu te amo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. *Elnara Márcia Negri*, pelo acolhimento e ensinamentos valiosos. Muito obrigada por sua orientação e paciência e, acima de tudo, pela ajuda na concretização do meu sonho de vida. Que Deus sempre ilumine os seus caminhos.

À querida *Cláudia Simeire Albertini Yagi* que eu admiro tanto. A primeira que acreditou em mim e, se estou aqui hoje, é por “culpa” sua! Obrigada por tudo Clau! Desejo-lhe sempre tudo de bom!

Às amigas muito especiais *Regiani Carvalho de Oliveira e Mariângela Macchione*, minhas mestras do Laboratório do Muco e Defesa Pulmonar. Obrigada pelo carinho e pelo acolhimento. Vocês foram meus anjos da guarda nessa jornada.

À *Susimeire Gomes* pela sua luz, sua paciência, seus ensinamentos grandiosos. Você é o exemplo de profissionalismo, dedicação e respeito à pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. *Paulo Hilario Nascimento Saldiva* pelo incentivo e disposição em ajudar.

Aos Profs. *Marcelo Amato e Carlos Carvalho* pelo interesse, incentivo e amplo apoio no desenvolvimento desse estudo na UTI Animal.

À Profa. *Elia Garcia Caldini* meu muito obrigado pelos preciosos ensinamentos. Hoje eu “vejo o microscópio com outros olhos”.

Às Dras. *Marisa Dolhnikoff* e *Maria Lúcia Garcia* pelos ensinamentos e observações construtivas.

Ao Prof. Dr. *Raymundo Soares de Azevedo Neto* pelo exemplo, pela simpatia e pelas dicas sempre pertinentes.

Às amigas *Christiane Calciolari*, *Kelly Yoshizake*, *Luciana Rabello*, *Andrea Cristina Pereira*, *Lícia Akinaga*, *Alessandra Choqueta*, *Naomi Nakagawa*, *Danielle Goto*, *Gabriela Manfrim*, *Mary Anne Olm*, *Karina Andrighetti*, *Dolores Rivero*, *Ana Julia Lichtenfels*, *Eliane Tigre*, *Heloisa Bueno*, *Janaína Proença*, *Aretha de Souza*, *Márcia Sueli Bento*, *Maria Dalva Gomes Santana*, *Eunilda Cavalcante*, *Tatiana Lanças*, *Raquel Annoni*, *Ana Laura Carvalho*, *Maína Morales*, *Bianca de Araújo*, *Denise Carnieli*, *Miriam Lemos*, *Cibele Berto*, *Adriana Lunardi*, *Fabiana Leoratti*, *Renata Leite* e aos amigos *Ruy Neto*, *Diógenes Ferreira* e *Rogério Pazetti* pelo apoio e ajuda incondicional.

Agradeço igualmente aos companheiros do LIM 09, *Marcelo do Amaral Beraldo*, *Neide Ribeiro*, *Otília Batista*, *Karina Timenetsky* e *Raquel Belmino* que me auxiliaram e me ensinaram tanto. Obrigada de coração!

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular FMUSP: *Marcelo Alves Ferreira, Nilsa Regina Damaceno Rodrigues, Maria Íres Amorim Mendes, Adão Caetano Sobrinho, Felipe Garcia Alves, Valéria Veiga Sales, Cristina Viveiros Cordeiro da Fonseca, Mirian Regina Simone, Maria Cecília Marcondes, Maria Margarida Monteiro e Gildásio Vieira Rocha.*

Às dedicadas *Liduvina de Barros, Vera Lúcia Carvalho, Weluma de Souza, Emília de Araujo e Anna Mary Zenker Brandão* pela excelência do trabalho e disposição com os alunos e orientadores desse programa de pós-graduação. Agora o “mexidinho” é com vocês.

À Profa. *Cida Basile* e estimadas *Silvia Itzcovici Abensur, Gladis dos Santos, Maria Sônia Patrício de Almeida e Gisela Aparecida Dantas de Macedo* que sempre me acolheram tão bem e participaram dos meus momentos maravilhosos no PAE – Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

À Profa. *Raquel Casarotto*, Prof. *Celso Carvalho* e Prof. *Carlos Augusto Pasqualucci* pelos exemplos de docência, pelos ensinamentos e pela oportunidade de aprender.

À FAPESP pelo apoio financeiro e pela liberação do estágio docente, de extrema importância para a formação do pós-graduando.

A realização de uma pesquisa requer somatório de recursos, tempo e disposição. Agradeço também o apoio da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP e dos Laboratórios de Investigação Médica: LIM 05 e LIM 59 – Departamento de Patologia, LIM 09 – Departamento de Córdio-Pneumologia e LIM 51 – Departamento de Emergências Clínicas, sem os quais a disponibilidade de tempo e a motivação não seriam suficientes para a colheita dos frutos desse estudo.

Às amigas e amigos não citados aqui em nome, mas guardados com carinho no coração. Agradeço ao sorriso, ao bom dia caloroso, ao aceno de cabeça afetuoso. Estes gestos, muitas vezes anônimos, tornavam um dia difícil bem mais leve e agradável.

Aos amigos tão queridos dessa jornada: *Maria Aparecida Nogueira, Maria Júlia Pinto Porto, Ester Almeida* (In Memoriam), *Dra. Ises Abrahamsohn, Dr. Paulo Abrahamsohn, Dr. Granadeiro Guimarães* (In Memoriam), *Maria Helena Motta Rodrigues Alves, Eliana Marchi Azevedo, Luiza Dante Marchi, Juliana Marchi de Castro e Azevedo*. Agradeço a Deus a oportunidade de ter conhecido estas pessoas especiais!

À minha avó *Miriam Cuglovici* (In Memoriam) e minha mãe *Felicia Schmeling*, pela força e pelo incentivo sempre.

À minha irmã *Monica Schmeling Barbosa* e pelo nosso reencontro. *Monica*, eu te adoro!

Às minhas tias *Lori Schmeling, Regina e Áurea* que achavam que o meu marido um dia ia acordar com um livro ao lado.

À minha sogra *Helena Buckhazi Piccin* e meu sogro *Paschoalino Piccin* pelo carinho, compreensão e pela disposição em ajudar sempre.

Às minhas filhas *Priscila Schmeling Piccin e Andressa Schmeling Piccin*, estrelas da minha vida.

Ao meu marido *Roberto Buckhazi Piccin*, meu sol.

A Deus que permite o sentido de nossa vida.

“Cada um como Deus o fez”.

(Citado por José Granadeiro Guimarães)

A acepção desse fato talvez seja o nosso maior desafio diário.

Esta pesquisa recebeu subsídio financeiro da

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Bolsa de Doutorado Direto: Processo nº 2006/50725-8

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	Ventilação mecânica e lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica.....	2
1.2	O sistema respiratório e suas defesas.....	13
1.3	Aparelho mucociliar.....	17
1.4	Hipótese e justificativa.....	33
2	OBJETIVO.....	35
3	MÉTODOS.....	37
3.1	Protocolos de ventilação mecânica.....	39
3.1.1	Crterios para definição de LPIV.....	43
3.2	Avaliação da função mucociliar.....	43
3.2.1	Transporte mucociliar in situ.....	44
3.2.2	Frequência do batimento ciliar.....	45
3.2.3	Transportabilidade pelo método palato de rã.....	46
3.2.4	Ângulo de contato.....	48
3.3	Morfometria e morfologia.....	50
3.3.1	Infiltrado inflamatório.....	50
3.3.2	Muco ácido e muco neutro.....	51
3.3.3	Microscopia eletrônica.....	54
3.4	Análise estatística.....	55
4	RESULTADOS.....	57

4.1	Ventilação e sinais vitais.....	57
4.2	Efeitos da ventilação mecânica sobre o pulmão.....	60
4.2.1	Avaliação macroscópica.....	60
4.2.2	Infiltrado inflamatório.....	62
4.2.3	Lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica.....	66
4.3	Função mucociliar.....	66
4.3.1	Muco ácido e muco neutro.....	71
4.3.1.1	Traquéia.....	71
4.3.1.2	Bronquíolos.....	75
4.3.2	Microscopia Eletrônica.....	78
5	DISCUSSÃO	82
5.1	Função mucociliar.....	83
5.1.1	Transportabilidade em traquéia.....	83
5.1.2	Transportabilidade em palato.....	84
5.1.3	Frequência de batimento ciliar.....	86
5.1.4	Ângulo de contato.....	88
5.2	Muco ácido e muco neutro.....	90
5.3	Morfologia celular do aparelho mucociliar.....	92
5.4	Ventilação mecânica e pulmão.....	95
5.5	Limitações.....	102
6	CONCLUSÃO	107
7	ANEXOS	109
8	REFERÊNCIAS	121

LISTAS

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	por cento
&	e
<	menor que
=	igual a
±	mais ou menos
µl	microlitro
µm ²	micrômetros quadrados
1:1	um para um
C _{dy}	complacência dinâmica
cmH ₂ O	centímetros de água
cmH ₂ O/L/ seg	centímetros de água por litro por segundo
Com	comércio
et al.	e outros
EtCO ₂	dióxido de carbono ao fim da expiração
FC	frequência cardíaca
FiO ₂	fração inspirada de oxigênio
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Fr	French
FR	frequência respiratória
HE	Hematoxilina-Eosina
HZ	Hertz
Ind	indústria
L/m	litros por minuto
Ltda	limitada
m ²	metros quadrados
ME	microscopia eletrônica
mg/Kg	miligramas por kilogramas
ml	mililitros
ml/cmH ₂ O	mililitro por centímetro de água
ml/Kg	mililitros por quilograma

mm	milímetros
mm/min	milímetros por minuto
mm/s	milímetros por segundo
mmHg	milímetros de mercúrio
mmol/L	milimol por litro
nº	número
° C	graus Celsius
°	graus
p	probabilidade (estatística)
PaCO₂	pressão parcial de gás carbônico no sangue arterial
PaO₂	pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PAS/AB	combinação de ácido periódico de Shiff e azul alciano
PEEP	pressão expiratória final positiva
pH	potencial de hidrogênio
Pmédia	pressão média
Ppico	pressão de pico
Pplat	pressão de platô
rpm	respirações por minuto
R_{ti}	resistência tecidual
SaO₂	saturação arterial da oxihemoglobina
VC	volume corrente
Vt	volume corrente
x	vezes

FIGURAS

Figura 1 –	Forças de tensão e cisalhamento geradas pela ventilação mecânica e sua participação em diferentes setores do sistema respiratório.....	6
Figura 2 –	Estrutura do epitélio respiratório.....	17
Figura 3 –	Esquema representando o mecanismo de transporte mucociliar com a camada sol e camada gel do muco respiratório.....	19
Figura 4 –	Esquema mostrando detalhes da estrutura em corte transversal do cílio envolto pela membrana plasmática	20
Figura 5 –	Ciclo do batimento ciliar visto de perfil e do topo da superfície.....	22
Figura 6 –	Diagrama esquemático do polímero constituindo um gel.....	24
Figura 7 –	Representação esquemática do modelo “jack-in-the-box” para a secreção de mucina.....	25
Figura 8 –	Regulação da gene transcrição do MUC5AC.....	27
Figura 9 –	Mecanismo proposto de ativação autócrina de EGFR em células epiteliais de brônquios após estresse mecânico.....	28
Figura 10 –	Muco recobrindo o epitélio respiratório.....	31
Figura 11 –	Mecanismos de absorção e secreção de íons, água e eletrólitos do epitélio respiratório.....	32
Figura 12 –	Esquema demonstrando as áreas da traquéia dos coelhos onde foram coletadas as amostras de muco e amostras de tecido traqueal para avaliação histopatológica e da função mucociliar.....	42
Figura 13 –	Representação esquemática do transporte mucociliar em palato de rã.....	47
Figura 14 –	Representação esquemática do equipamento utilizado para a medida do ângulo de contato.....	48
Figura 15 –	Análise macroscópica de pulmões de coelhos.....	61

Figura 16 –	Parênquima pulmonar dos grupos: Sham (A), Baixo Volume (B), Alto Volume (C) e Alta Pressão (D) - (HE 400x).....	65
Figura 17 –	Muco observado no epitélio traqueal dos grupos: Sham (A), Baixo Volume (B), Alto Volume (C) e Alta Pressão (D) - (PAS/AB 400x).....	73
Figura 18 –	Muco observado no epitélio de bronquíolos dos grupos: Sham (A), Baixo Volume (B), Alto Volume (C) e Alta Pressão (D) - (PAS/AB 400x).....	77
Figura 19 –	Microscopia eletrônica dos grupos Sham (A), Baixo Volume (B), Alto Volume (C) e Alta Pressão (D)	79

GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Número de células polimorfonucleares (infiltrado inflamatório) observado em parênquima pulmonar dos animais do grupo Sham e grupos expostos aos protocolos de VM..... 63
- Gráfico 2** – Reprodução gráfica da transportabilidade do muco *in situ* (traquéia de coelho) nos grupos ventilados (Baixo Volume/BV, Alto Volume/AV e Alta Pressão/AP)..... 67
- Gráfico 3** – Reprodução gráfica da transportabilidade do muco *in vitro* (palato de rã) nos grupos ventilados (Baixo Volume/BV, Alto Volume/AV e Alta Pressão/AP)..... 68
- Gráfico 4** – Reprodução gráfica da frequência de batimento ciliar observada na traquéia de coelho nos grupos ventilados (Baixo Volume/BV, Alto Volume/AV e Alta Pressão/AP)... 69
- Gráfico 5** – Reprodução gráfica da medida do ângulo de contato do muco dos animais dos grupos ventilados (Baixo Volume/BV, Alto Volume/AV e Alta Pressão/AP)..... 70
- Gráfico 6** – Relação área de muco/fração de parênquima observada no epitélio traqueal dos grupos Sham, Baixo Volume (BV), Alto Volume (AV) e Alta Pressão (AP)..... 72
- Gráfico 7** – Espessura do epitélio traqueal de coelhos nos grupos Sham e grupos ventilados (Baixo Volume/BV, Alto Volume/AV e Alta Pressão/AP)..... 74
- Gráfico 8** – Área de muco observada no epitélio de bronquíolos de coelhos nos grupos Sham, Baixo Volume (BV), Alto Volume (AV) e Alta Pressão (AP)..... 76
- Gráfico 9** – Espessura do epitélio de bronquíolos de coelhos nos grupos Sham, BV, AV e AP (Média e Desvio Padrão)..... 78

TABELAS

Tabela 1 –	Sinais vitais.....	57
Tabela 2 –	Parâmetros ventilatórios.....	58
Tabela 3 –	Ventilação mecânica (VM).....	59
Tabela 4 –	Nº de células polimorfonucleares por área de parênquima pulmonar (μm^2).....	62
Tabela 5 –	Transportabilidade em traquéia de coelho (TMCT).....	67
Tabela 6 –	Transportabilidade em palato de rã (TMC).....	68
Tabela 7 –	Frequência de batimento ciliar (FBC).....	69
Tabela 8 –	Ângulo de contato (AC).....	70
Tabela 9 –	Muco em traquéia de coelhos (em μm^2).....	71
Tabela 10 –	Muco em bronquíolos de coelhos (em μm^2).....	75

RESUMO

Piccin VS. *Efeitos da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica sobre o epitélio das vias aéreas de condução e sua influência no aparelho mucociliar: modelo experimental em coelhos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 135p.

A ventilação mecânica (VM) pode ser causa de lesão pulmonar sendo este fato reconhecido na literatura como Lesão Pulmonar Induzida pela Ventilação Mecânica (LPIV), onde alterações tanto fisiológicas quanto morfológicas são evidenciadas no pulmão. O objetivo desse trabalho foi avaliar a repercussão das forças envolvidas na ventilação mecânica através de diferentes mecanismos de LPIV sobre o sistema mucociliar pela análise funcional e histopatológica desse aparelho. Em um estudo controlado e randomizado vinte e sete coelhos machos da raça Nova Zelândia foram separados em quatro grupos. Nos primeiros trinta minutos foram submetidos à VM com volume corrente de 8 ml/kg peso, fluxo de 3 L/minuto, e pressão positiva expiratória final (PEEP) de 5 cm H₂O e FIO₂ de 0,4, sendo que o grupo Sham (n=6) foi ventilado por apenas 10 minutos. Os grupos Baixo Volume/BV (n=6; Vt 8, Ppico 17, Pmédia 9, PEEP 5, Fluxo 3), Alto Volume/AV (n=7; Vt 16, Ppico 27, Pmédia 12, PEEP 5, Fluxo 5) e Alta Pressão/AP (n=8; Vt 8, Ppico 30, Pmédia 20, PEEP 12, Fluxo 9) foram ventilados por mais 3 horas. A mecânica do sistema respiratório foi registrada pelo sistema *Labview*®. Foram acompanhados os valores de gasometria e sinais vitais. Amostras de tecido pulmonar foram coradas com H&E para análise de infiltrado inflamatório. Analisou-se a frequência de batimento ciliar (FBC), transporte mucociliar na traqueia (TMCT), transportabilidade em palato de rã (MCT) e ângulo de contato (AC). Amostras de pulmão e traquéia foram coradas pela técnica PAS/AB para avaliação do muco. Observamos diminuição da complacência do sistema respiratório (p<0,05) no grupo AP em comparação com os demais grupos ventilados. Os grupos BV, AV e AP apresentaram um aumento de células polimorfonucleares por área de parênquima pulmonar (p<0,001) em

comparação com o grupo Sham. Não foram observadas diferenças quanto ao TMCT e AC nos grupos ventilados. A transportabilidade em palato diminuiu no grupo BV ($p=0,007$) ao final do protocolo de ventilação (1,42 com variações de 2,11-0,99 para 0,95 com variações de 1,15-0,92). A FBC diminuiu ($p=0,047$) no grupo AP quando comparamos os valores iniciais (13,51 variação de 14,49-11,62) e finais ao protocolo de VM (11,69 variação de 14,18-10,12). Respostas fisiológicas e microscopia eletrônica (ME) da traquéia corroboram a disfunção da FBC no grupo AP. Na traquéia os grupos ventilados apresentaram uma diminuição da quantidade de muco total (BV 2.018, AV 3.219 e AP 2.883) e de muco ácido (BV 672, AV 240 e AP 480) por μm^2 de tecido pulmonar por campo estudado ($p<0.05$) quando comparados com o grupo Sham (4.660 μm^2 de muco total e 1.873 μm^2 de muco ácido). Em bronquíolos distais a quantidade de muco total diminuiu nos grupos BV e AP ($p<0.05$) quando comparados aos grupos Sham e AV. O mesmo fenômeno foi observado com relação ao muco neutro. Concluímos que as forças geradas pela ventilação mecânica têm impacto direto sobre o aparelho mucociliar, alterando suas propriedades funcionais e sua morfologia. Aparentemente a VM acarreta desequilíbrio na produção de muco, sendo essa alteração mais visível quando utilizado um alto volume corrente e uma maior pressão média pulmonar (associada a um fluxo de ar aumentado). O aumento da pressão média com alto fluxo dos gases ventilados também ocasiona maior sofrimento celular do aparelho mucociliar, disfunção da frequência de batimento ciliar e provável perda ciliar. Tais alterações se devem provavelmente ao efeito das forças físicas geradas pela VM associadas a prováveis oscilações na resposta inflamatória e no fluxo sanguíneo local.

Descritores: 1.Depuração mucociliar; 2.Muco; 3.Cílios; 4.Ventilação mecânica; 5.Traumatismo pulmonar induzido por respirador; 6. Mecanotransdução celular

SUMMARY

Piccin VS. *Effects of ventilator-induced lung injury on airway-ciliated epithelia and the influence on mucociliary transport system* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 135p.

Mechanical ventilation (MV) can result in a medical complication named Ventilator-Induced Lung Injury (VILI), where physiologic and morphologic alterations in the lungs have been reported. In this study, we have hypothesized that MV-induced injury can have a major impact on the mucociliary system. In a randomized controlled trial twenty-seven male New Zealand rabbits were separated into four groups. During the first thirty minutes all rabbits were subjected to MV with tidal volume of 8 ml/kg of body weight, 3 L/minute of flow, positive end expiratory pressure (PEEP) of 5 cm H₂O and FIO₂ of 0.4. After that the study animals were divided into 4 groups: Sham (n=6) was ventilated for ten minutes, Lower Volume/LV (n=6; Vt 8, P peak 17, P mean 9, PEEP 5, Flow 3), High Volume/HV (n=7; Vt 16, P peak 27, P mean 12, PEEP 5, Flow 5) and High Pressure/HP (n=8; Vt 8, P peak 30, P mean 20, PEEP 12, Flow 9) and ventilated for 3 hours more. Respiratory system mechanics was recorded using *Labview®*. Blood gasometry and vital signals were monitored. Lung tissue sections were stained by H&E to analyze inflammation. We also studied the ciliary beating frequency (CBF), tracheal mucociliary transport (TMCT) *in situ* and *in vitro*, mucus contact angle (CA) and respiratory mucus viscosity. To quantify mucosubstances, tracheal samples were stained with PAS/AB. As a result we have that the respiratory system compliance decreased ($p<0.05$) in the HP group compared to other ventilated groups. All ventilated groups showed an increase in polymorphonuclear cells quantity per area of lung parenchyma ($p<0.001$) compared to the Sham group. There were no differences in TMCT and CA among ventilated groups, when initial and final measurements were compared. MCT significantly decreased in the LV group ($p=0.007$) after the protocol (1.42 range of 2.11-0.99 to 0.95 range of 1.15-0.92). The CBF significantly decreased ($p=0.047$) in the HP group when the initial (13.51

range of 14.49-11.62) and final (11.69 range of 14.18-10.12) measurements were compared. Physiological data and tracheal electronic microscopy confirm the CBF dysfunction observed in the AP group. In the trachea all ventilated groups showed a significant decrease in total mucus (LV 2,018, HV 3,219 and HP 2,883) and acid mucus (LV 672, HV 240 and HP 480) per μm^2 of lung tissue ($p<0.05$) compared to the sham group (4,660 μm^2 of total mucus and 1,873 μm^2 of acid mucus). In distal bronchioles there was a significant decrease in total mucus in the LV and HP group ($p<0.05$) compared to Sham and HV groups. The same phenomenon was observed regarding neutral mucus. We concluded that mechanical forces involved in MV affect mucociliary function. Mechanical ventilation probably leads to the dysfunction on the mucus production. This phenomenon is better perceived when higher volume and higher mean pressure (associated with inspired gases high flow) are used. An increase of the mean pressure combined with inspired gases high flow also leads to mucociliary cells suffering, to ciliary beat frequency dysfunction and probably cilia loss. These alterations probably occur due to the effect of the physical forces generated by the mechanical ventilation in association with the oscillation of the inflammatory response and local blood flow.

Descriptors: 1.Mucociliary clearance; 2.Mucus; 3.Cilia; 4.Mechanical ventilation; 5.Ventilator-induced lung injury; 6.Cellular mechanotransduction

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ventilação mecânica e lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica

Desde a utilização do fole manual por Paracelso (1530) para insuflar pulmões de pessoas recentemente falecidas até os dias atuais, quando intensivistas dispõem de modernos equipamentos de suporte ventilatório, o tema Ventilação Mecânica (VM) tem sido objeto de muitos estudos. Não obstante, ainda apresenta lacunas quanto a sua atuação e impacto em múltiplos órgãos e sistemas do organismo humano (Terzi e Carvalho, 2003).

De forma conceitual a ventilação mecânica pode ser entendida como a manutenção da oxigenação e da ventilação em pacientes portadores de insuficiência respiratória aguda, de maneira artificial, até que estejam capacitados a reassumi-las (Barbas et al., 2002). Indiscutivelmente trata-se do mais importante aspecto de suporte de vida para pacientes com falência respiratória.

Como qualquer outra terapia, a ventilação mecânica apresenta efeitos colaterais (Villar, 2005). Um desses efeitos, denominado Lesão Pulmonar Induzida pela Ventilação Mecânica (LPIV), tem sido grande item de investigação, uma vez que representa um potencial fator de risco em pacientes ventilados mecanicamente (Lionetti et al., 2005). O conceito de

LPIV foi estabelecido a partir de evidências visíveis, como a dispersão aérea, e evidências mais sutis, como o desenvolvimento de edema intersticial, edema alveolar e ruptura epitelial. Além disso, recentes pesquisas apontam para o papel das células inflamatórias e mediadores na lesão pulmonar, bem como a própria resposta intracelular ao estresse mecânico (Sibilla et al., 2002) como fatores relacionados à LPIV.

Geralmente, a assistência ventilatória ao paciente crítico é realizada através de um modo ventilatório determinado por um conjunto de ajustes no ventilador que faz com que o equipamento de ventilação mecânica obedeça a regras específicas. O modo volume controlado permite o ajuste do fluxo e do volume corrente, sendo a pressão da via aérea consequência da mecânica pulmonar do paciente. Se a complacência for baixa ou a resistência elevada, terá valores de pressão elástica ou resistiva elevados e o ventilador deverá desenvolver pressões mais altas para suplantá-la e fazer com que o volume de ar previamente determinado entre nos pulmões. Por outro lado, se o aparelho for ajustado para controlar a pressão na via aérea, o fluxo e o volume corrente decorrerão da mecânica pulmonar do paciente. Se o paciente tiver uma complacência baixa, seu componente de pressão elástica se elevará. Como o ventilador não permite que a pressão ultrapasse o limite previamente determinado pelo operador, o volume corrente automaticamente cairá (Pompílio e Carvalho, 2003). Como pode ser observado, não são pequenos os desafios de uma adequada estratégia ventilatória, mas de forma geral preconiza-se a utilização de baixos volumes correntes (7 – 8 ml/Kg), associado a uma pressão expiratória final positiva

(PEEP) previamente determinada. Para diminuição da pressão inspiratória a estratégia recomendada é a mudança do padrão do fluxo inspiratório (fluxo decrescente). Evidentemente trata-se de uma maneira simplificada de demonstrar o gerenciamento do paciente com suporte ventilatório, que envolve várias outras estratégias. De qualquer forma a questão fundamental já demonstrada em situação experimental é que altos volumes correntes e altas pressões inspiratórias podem ser responsáveis por lesões pulmonares graves durante a ventilação mecânica, caracterizadas por membrana hialina, infiltração de granulócitos, e extravasamento das hemácias, associadas a uma permeabilidade vascular pulmonar bastante aumentada, entre outros. Volumes correntes de 12 ml/Kg em humanos assim como pressões inspiratórias habitualmente utilizadas na ventilação mecânica (25 - 40 cmH₂O) parecem ser capazes de produzir lesões pulmonares mais graves do que aquelas decorrentes do uso de altas frações inspiradas de oxigênio. Períodos tão curtos como 30 minutos são suficientes para desencadear essas lesões em pulmões normais. Associado a estas lesões observa-se também o aparecimento de hipotensão arterial sistêmica e disfunção de múltiplos órgãos (Barbas et al., 2002).

Entretanto, antes de considerarmos mais aprofundadamente a influência do volume corrente e da pressão inspiratória no sistema respiratório, é pertinente ponderar que, na fisiologia normal, as células no pulmão estão normalmente sujeitas a uma variedade de forças mecânicas como resultado da natureza dinâmica da função pulmonar (Schumacker, 2002). Uma dessas forças de tensão é denominada força de cisalhamento

("shear stress") e ocorre nas vias aéreas de condução devido ao fluxo aéreo. Sendo produzida quando o ar move-se pela superfície celular, gera uma tensão paralela à membrana plasmática acarretando em uma deformação dessa membrana. Uma segunda forma de deformação sofrida pelo pulmão refere-se à tensão mecânica. A tensão ocorre quando determinada força é aplicada a uma célula que, sendo elástica, causa um estiramento ou uma deformação mecânica. Em estados patológicos como lesão pulmonar aguda, onde a diminuição da elasticidade pulmonar é relevante, a magnitude da força de tensão mecânica está aumentada, com consequente ampliação do nível de esforço (Schumacker, 2002).

É importante observar que as células sujeitas à força de tensão mecânica ou cisalhamento apresentam diversos e extensos níveis de resposta.

A Figura 1 apresenta de forma ilustrativa como estas forças estão distribuídas no sistema respiratório.

FONTE: Modificado de Fishman AP, pulmonary diseases and disorders em Welsh MJ, 1988.

Figura 1 – Forças de tensão (setas vermelhas) e cisalhamento (setas azuis) geradas pela ventilação mecânica e sua participação em diferentes setores do sistema respiratório.

NOTA: EP: Epitélio; BM: Membrana basal; SM: Glândula submucosa; FC: Fibrocartilagem.

Durante a ventilação mecânica as forças de tensão e cisalhamento não representam mais aquelas observadas na atividade normal da função respiratória. Estas forças, devido a um princípio de geração mecânica de fluxo, estão diminuídas ou aumentadas de acordo com o padrão ventilatório adotado e seus ajustes específicos, seja este modo volume controlado ou pressão controlada. Schulz (1959) foi o primeiro autor a descrever as consequências patológicas nos pulmões mecanicamente ventilados, sugerindo que o estresse mecânico da camada interna dos alvéolos (causado pela hiperdistensão) pode mudar as características surfactantes (citado por Duarte et al., 2003). A partir de então várias pesquisas se

seguiram com o objetivo de entender melhor a transformação do sinal mecânico gerado pelo ventilador em sinal biológico (mecanotransdução), e suas possíveis consequências ao organismo.

O significado e impacto da mecanotransdução no sistema pulmonar bem como os mecanismos moleculares dos mecanossensores celulares ainda não estão totalmente estabelecidos. Desde que o mecanossensor é definido como um sistema que detecta tensão mecânica na célula e converte esta deformação em um sinal biológico, os mecanismos apontados como responsáveis por esta interpretação de sinais de distorção incluem os canais iônicos sensíveis ao estiramento, interações citoesqueléticas e outros sistemas. Parte da dificuldade em identificar a chave do processo mecanossensor está em identificar qual exatamente é o estágio em que este mecanossensor é ativado (Schumacker, 2002).

O papel da falência por estresse e reparo da membrana plasmática epitelial tem sido discutido como importante mecanismo de base mediador da lesão pulmonar por estresse mecânico. As células experienciam a falência por estresse da membrana plasmática quando a matriz à qual estão aderidas sofre uma grande deformação (Matthay et al., 2002). No pulmão, semelhante mecanismo pode ajudar a explicar a lesão celular decorrente de ventilação mecânica. Vlahakis e Hubmayr (2002) demonstraram que a deformação mecânica dos pulmões induz o tráfego de lipídios para a membrana plasmática de células epiteliais dos alvéolos, acarretando aumento da superfície celular. Esse mecanismo é um processo dependente de temperatura e, conseqüentemente, de energia e envolve o movimento de

vesículas através da membrana. Condições associadas que inibem este processo de defesa envolvem baixa temperatura, baixo colesterol e enfraquecimento citoesquelético. Esses pesquisadores, ainda considerando o papel de proteção do tráfego de lipídios, recentemente demonstraram que a lesão celular por estresse é significativamente aumentada quando esse tráfego é inibido (Vlahakis e Hubmayr, 2002). Devido à observação das propriedades mecânicas das células, onde se constatou a associação entre a inibição da resposta de remodelação e a lesão, foi levantada a hipótese de que a remodelação celular é um mecanismo mais importante para a citoproteção contra a deformidade ou ruptura por tensão do que os elementos de conectividade e resistência representados pelos componentes celulares de suporte de tensão (Vlahakis e Hubmayr, 2002). Os autores sugerem que o movimento dos lipídios deve ser considerado em pesquisas de agentes de proteção contra a lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica. Em outro estudo, Atabai et al. (2002) sugerem que o fator de crescimento de células epiteliais ("Keratinocyte Growth Factor" – KGF) pode intensificar o reparo do epitélio alveolar por mecanismos que não incluiriam o de multiplicação celular. Foi administrado KGF (5 mg/Kg), via intratraqueal, em ratos 48 h antes do isolamento de pneumócitos do tipo II. As células previamente tratadas com KGF apresentaram um expressivo nível de reparo epitelial quando comparadas com as do grupo controle, sugerindo que experimentalmente esta proteína auxilia na recuperação da lesão pulmonar aguda. Lim et al. (2002) apresentaram evidências, em estudo *in vivo*, de que a tensão excessiva em vias aéreas pode induzir o movimento de células

inflamatórias para a microcirculação local de ratos. Neste estudo, os autores desenvolveram uma nova aplicação da microscopia intravital em ratos anestesiados, mecanicamente ventilados, possibilitando a direta observação do influxo leucocitário na circulação traqueobronqueal. Neste estudo a ventilação normal foi mantida com 80 respirações por minuto, com 6 ml/Kg de volume e 0 cmH₂O de pressão positiva expiratória final (PEEP). O aumento da tensão pulmonar foi induzido pelo aumento da PEEP para 8 cmH₂O em diferentes intervalos de tempo. A ventilação normal não alterou a velocidade de recrutamento leucocitário e tampouco o número de ligações celulares. Em contraste, o aumento do PEEP por uma hora induziu um considerável decréscimo na pressão sanguínea, com recuperação dos valores de base em trinta minutos. O evento de redução tempo-dependente da velocidade de recrutamento leucocitário permanece assim mesmo após a redução da PEEP excessiva. No entanto, o número de receptores endoteliais atinge seu patamar em uma hora de observação, retornando aos valores de base em duas horas, o que sugere que o endotélio não é irreversivelmente ativado com a sustentação da tensão pulmonar devido á utilização da PEEP. Os autores especularam que o recrutamento leucocitário é o resultado direto do aumento da tensão no pulmão resultando no desencadeamento local de mediadores inflamatórios e na ativação do endotélio das vias aéreas. Para confirmar esta hipótese, foram apresentados dados demonstrando que o aumento da tensão no pulmão não modifica o tráfego leucocitário no mesentério de ratos, não obstante a similar redução da pressão sanguínea. Esses dados confirmam a hipótese de que a

excessiva tensão no pulmão durante a ventilação mecânica pode desencadear eventos deletérios em pacientes com patologias em vias aéreas. Frank et al. (2002) induziram dano pulmonar em ratos ventilados com diferentes protocolos de ventilação mecânica. Os ratos foram randomizados em três grupos, com 12, 6 ou 3 ml/Kg de volume corrente na ventilação e PEEP de 10 cmH₂O. Como esperado, o grupo de 12 ml/kg de volume corrente apresentou um visível extravazamento de água no pulmão após 4 horas. O grupo com volume corrente de 6 ml/Kg de peso corpóreo, similar ao grupo com estratégia protetora de ventilação mecânica utilizada pelo National Institutes of Health, notadamente apresentou redução do edema pulmonar. O grupo de 3 ml/kg de volume corrente igualmente apresentou redução do edema pulmonar. Existem evidências de que o adicional efeito de proteção do uso de 3 ml/Kg de volume corrente pode ser explicado pelo favorecimento da proteção contra lesões epiteliais alveolares, baseadas em estudos biomecânicos sobre antígenos de célula epitelial do tipo I bem como pela expressão melhorada do surfactante proteína C e a normalização da capacidade de transporte do fluido alveolar. Histologicamente pode ser observada a diminuição do edema e da inflamação com estratégias de baixo volume corrente. Dessa maneira, existe um efeito de proteção relacionado às estratégias ventilatórias que possibilitam a redução de lesão no endotélio pulmonar, mas o adicional efeito de proteção do uso de baixo volume corrente parece ser explicado pela limitação de lesão no epitélio alveolar. Sabe-se atualmente que estratégias protetoras de ventilação mecânica conduzem a um declínio na

mortalidade de pacientes com sintomas clínicos de lesão pulmonar aguda (Matthay et al., 2002).

Na literatura científica percebe-se que o estiramento somente afetará o pulmão se esta força for suficiente para acarretar falência mecânica dos elementos estruturais. De modo signficante, não existe dúvidas da importância da distorção mecânica na fisiologia ou fisiopatologia do pulmão (Schumacker, 2002), porém a questão continua a requerer a colaboração de vários profissionais para sua resposta.

Adicionalmente ao estudo do impacto das forças mecânicas da VM sobre o pulmão distal, surgiram pesquisas *in vitro* com foco no estudo do efeito da estimulação mecânica sobre células do aparelho mucociliar e sobre as propriedades do muco. Sanderson e Dirksen (1986) observaram que a estimulação mecânica da superfície de cultura de células ciliadas derivadas da traquéia de coelhos resultava em um aumento transitório do batimento ciliar de vinte por cento ou mais não apenas na célula estimulada, mas até mesmo nas células vizinhas àquela. Sanderson et al. (1990) também mostraram que a estimulação mecânica em culturas de células ciliadas do epitélio respiratório de coelhos desencadeia uma onda de propagação de cálcio (Ca^{2+}) através de mecanismos de comunicação intercelular. Esta comunicação capacita as células na coordenação de suas atividades fisiológicas estabelecendo um padrão de colaboração mútua. A abertura dos canais de cálcio através do estresse mecânico e sua participação na regulação do batimento ciliar foi também explorada por Winters et al. (2006) em tecido mucociliar extraído da traquéia de ratos. Estes pesquisadores

concluíram que complexas interações de componentes físicos e bioquímicos regulam a viscosidade do muco e a mobilidade ciliar. Moores et al. (1992) pesquisaram a ação da ventilação de alta frequência sobre muco expectorado de pacientes com bronquite crônica observando que o aumento da viscosidade e da elasticidade observados no muco após a aplicação desse estímulo específico poderia acarretar na redução do *clearance* pulmonar *in vivo*. Even-Tzur et al. (2008) verificaram que culturas de células humanas do epitélio nasal expostas a uma câmara simulando o estresse causado por diferentes fluxos de ar apresentavam um aumento na secreção de muco em relação as células não submetidas a tal estresse mecânico, sugerindo que o estímulo mecânico é representativo na função do epitélio nasal.

Porém, apesar de muito ter sido estudado sobre o impacto das forças de tensão e cisalhamento geradas pela ventilação mecânica sobre o parênquima pulmonar distal, e também alguns estudos *in vitro* terem sido desenvolvidos para pesquisar sobre o tema, existem poucos estudos *in vivo* que abordam as consequências das diferentes forças tensionais geradas pela ventilação mecânica sobre o aparelho mucociliar. Estes estudos envolvem ou pacientes com diferentes histórias clínicas geralmente abordando um padrão ventilatório em particular (Konrad et al., 1995; Nakagawa et al. 2000, Nakagawa et al. 2005; de Oliveira et al., 2006); ou pesquisas experimentais focando a ação no aparelho mucociliar de drogas específicas ou do posicionamento do corpo durante a ventilação mecânica (Nakagawa et al, 2004; Bassi et al., 2007).

Sabe-se, no entanto, na comunidade científica, que os achados de edema por aumento de permeabilidade, processo inflamatório com liberação de mediadores, congestão, inundação alveolar e atelectasias observados na LPIV (Duarte et al., 2003) acarretam acréscimo da quantidade de secreções no pulmão, dificuldade de depuração dessa secreção e proporcional aumento na ocorrência de infecção pulmonar. Assim, um melhor entendimento sobre lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica e sua influência sobre o aparelho mucociliar pode auxiliar no desenvolvimento de medidas para a defesa e *clearance* pulmonar.

Neste contexto, faremos uma breve revisão sobre o sistema respiratório e o aparelho mucociliar, bem como sobre os fatores determinantes para um adequado *clearance* pulmonar, como o epitélio respiratório, constituição do muco respiratório e transporte iônico.

1.2 O sistema respiratório e suas defesas

O sistema respiratório possui uma arquitetura voltada para a otimização de sua função primordial que é o de efetuar as trocas gasosas (Saldiva et al., 1990). As estruturas componentes desse sistema podem ser divididas entre aquelas que promovem a entrada e saída do ar do organismo e que fazem parte da zona condutora (o nariz, a nasofaringe, a laringe, a traquéia, os brônquios e os bronquíolos); e aquelas que facilitam o trânsito gasoso para o sangue e do sangue para o ambiente e estão situadas na

zona respiratória (os bronquíolos respiratórios ou terminais, os ductos alveolares e os sacos alveolares).

As vias aéreas representam a maior área de superfície epitelial do corpo humano em contato direto com o meio externo e, como consequência, são as que mais sofrem com as agressões advindas desse contato (Nakagawa, 2006). Em 24 horas um indivíduo adulto inala aproximadamente 12.000 litros de ar ambiente. Ao final de uma inspiração profunda 80% do volume pulmonar será composto de ar, 10% de sangue e 10% de tecido pulmonar propriamente dito, porém disposto de forma a otimizar a interface de troca (com extensão equivalente de 70 a 100m²). O ar inalado contém uma série de elementos potencialmente nocivos, tais como partículas orgânicas e inorgânicas, organismos vivos e mortos, vapores e fumaças, que são frequentemente depositados na superfície do trato respiratório (Saldiva et al., 1990; Nakagawa, 2006).

Entretanto, apesar da inalação contínua de agentes nocivos, os pulmões são limpos e estéreis. Isso ocorre porque as vias de condução são estruturadas anatômica e fisiologicamente para proteger a região alveolar (Lorenzi et al., 1991), seja através de respostas imunológicas inatas (não-específicas) ou adquiridas (específicas) (Nakagawa, 2006). O sistema de defesa inato é responsável pelo transporte de partículas e microorganismos depositados na superfície das vias aéreas e pela eliminação de patógenos nos alvéolos através do condicionamento do ar inspirado (umidificação, aquecimento e filtração), transporte mucociliar (ou transporte pela tosse) ou fagocitose pelos macrófagos na região alveolar. O sistema de defesa

adquirido é antígeno-específico, incluindo respostas imunológicas mediadas pela célula e pelo anticorpo (Nakagawa, 2006).

Concentramos nosso estudo na zona condutora, basicamente traquéia e bronquíolos, para efeito de análise e comparação dos efeitos da LPIV em partes distintas do sistema de defesa inato com função de transporte mucociliar.

A traquéia é o principal segmento condutor de ar nas vias aéreas, sendo formada por anéis cartilagosos em formato de meia-lua que se subdividem até chegar aos sacos aéreos. Sua convexidade é frontal, sendo apenas cilíndrica em sua parte anterior. Posteriormente a traquéia é plana e coberta por uma membrana. Na traquéia existe um revestimento interno mucoso e outro ciliar, onde os cílios se movem em direção à faringe, levando as impurezas e o excesso de muco. As paredes externas da traquéia são revestidas por musculatura lisa e recebem fibras dos ramos simpáticos e parassimpáticos do sistema neurovegetativo para regulação da resistência das vias aéreas e da intensidade do fluxo de ar. Existem receptores beta-adrenérgicos (β_2) no tecido desta musculatura lisa que quando estimulados pela noradrenalina da fibra simpática produzem relaxamento e consequente aumento do calibre da traquéia. Os receptores muscarínicos por suas vezes ligam-se a acetilcolina da fibra parassimpática e promovem a contração da musculatura com consequente diminuição da área livre de entrada do ar (Savarese e Rosinha, 2006).

A traquéia subdivide-se em dois ramos denominados respectivamente brônquio principal direito e brônquio principal esquerdo. Ocorrem, então,

sucessivas divisões dicotômicas e aproximadamente entre a 9ª e 19ª gerações encontram-se os bronquíolos (Leff e Schumacker, 1996). É importante observar que, à medida que as subdivisões avançam, os brônquios perdem cartilagem e ganham musculatura lisa comandada pelo sistema neurovegetativo. O número de células mucosas do revestimento interno permanece, mas o número de células ciliadas vai diminuindo até que estas desaparecem no bronquíolo terminal (Savarese e Rosinha, 2006).

Os bronquíolos são segmentos com 1 mm ou menos, com epitélio que varia desde cilíndrico simples ciliado até cúbico simples na sua porção final. As células caliciformes diminuem progressivamente, estando mesmo ausentes da medida em que os bronquíolos adquirem menor diâmetro. O epitélio dos bronquíolos apresenta regiões especializadas denominadas corpos neuroepiteliais que recebem inervação colinérgica. Estes corpos possuem células com grânulos de secreção que provavelmente estão envolvidas na resposta do bronquíolo frente a alterações na composição dos gases na luz bronquiolar. A lâmina própria dos bronquíolos é delgada e rica em fibras elásticas. Abaixo da mucosa encontra-se a camada muscular que é relativamente mais desenvolvida do que nos brônquios e está sob controle do sistema nervoso autônomo. A estimulação parassimpática aumenta o seu grau de contração diminuindo o diâmetro destes túbulos, ocorrendo o oposto com a estimulação simpática. Os menores bronquíolos com caráter condutor são revestidos por um epitélio cúbico simples contendo células de clara. Estas células secretam lipoproteínas com função de prevenir adesões no lúmen (Moriscot et al., 2004).

1.3 Aparelho mucociliar

O epitélio das vias de condução é pseudoestratificado ciliado e as células comprometidas com o transporte mucociliar podem ser divididas didaticamente em secretoras e ciliadas. As células ciliadas possuem cerca de 200 cílios, com cerca de cinco a sete micrômetros na região da traquéia, tornando-se progressivamente menores ao caminhar para a periferia do pulmão. Locais onde as principais fontes de secreção pulmonar estão presentes: 1. glândulas da submucosa, onde são encontradas as células mucosas e serosas (presentes somente nas vias aéreas cartilagosas); 2. epitélio das vias aéreas: células mucosas (ou “globet cells”), serosas e células de clara. Existem atualmente dez tipos celulares descritos no epitélio respiratório, incluindo-se células com papel ainda pouco conhecido (“special type” e “brush”) (Jeffery et al., 1983; Lorenzi et al., 1991) (Figura 2).

FONTE: Modificado de Morgenroth, 1988.

Figura 2 – Estrutura do epitélio respiratório. 1: célula ciliada; 2: célula secretora; 3: camada gel do muco respiratório; 4: capilares da submucosa; 5: fibras musculares da submucosa.

O muco respiratório reveste o epitélio pulmonar desde a traquéia até as unidades de troca gasosa, formando um filme líquido impermeável a água e medindo cerca de dois a cinco micrômetros de espessura (Figura 2). É composto por duas camadas; uma camada inferior denominada camada sol (fluido periciliar), que consiste de um fluido seroso, e a camada superior, denominada fase gel, que é constituída por um material visco-elástico.

O transporte mucociliar é o principal mecanismo de defesa pulmonar (Silberberg, 1990). As partículas inaladas, potencialmente nocivas ao organismo, se impactam ao longo das vias aéreas de condução e são adsorvidas pela camada de muco que recobre o epitélio (King et al., 1989; Lorenzi et al., 1991). Desta forma, uma questão muito relevante diz respeito aos mecanismos de retirada do muco das vias aéreas. Estes devem ser eficientes, pois a sua falência pode ter múltiplas implicações, tais como:

1. Facilitar a colonização de bactérias, aumentando-se o risco de infecções respiratórias (Braga, 1990);
2. Aumentar o tempo de contato de agentes agressores com o epitélio respiratório. Existem hipóteses que associam a falência do transporte mucociliar à carcinogênese pulmonar, por potencializar a ação de substâncias inaladas (Zayas et al., 1990).
3. A estase de muco pode acarretar graves distúrbios na ventilação, com aumento da resistência ao fluxo aéreo (Braga, 1990).

O mecanismo de transporte mucociliar pode ser comparado grosseiramente ao de uma esteira rolante. O motor do sistema é dado pelos cílios que batem continuamente, propiciando energia para o deslocamento

da camada de muco (Figura 3). Este transporte é feito nas vias aéreas respiratórias; o batimento ciliar impulsiona o muco no sentido cranial, em direção à orofaringe, onde é deglutido ou expectorado (Lorenzi et al., 1991; Saldiva et al., 1992).

FONTE: Modificado de Macchione, 1998.

Figura 3 – Esquema representando o mecanismo de transporte mucociliar com a camada sol e camada gel do muco respiratório. O batimento ciliar segue uma orientação rígida em direção a orofaringe.

O perfeito funcionamento do transporte mucociliar depende de fatores ligados ao cílio, ao muco e à interação adequada entre cílio e o muco (Houtmeyers et al., 1999). Portanto, para um transporte mucociliar eficiente é necessária a ação coordenada de três funções celulares: geração de força, função secretora, e transporte de água e íons. Uma falha em qualquer destes elementos pode ser suficiente para o colapso do transporte como um todo (Saldiva et al., 1992). À medida que ocorre falência do transporte mucociliar, o indivíduo passa a depender de uma forma progressivamente maior do transporte do muco realizado pela tosse (Puchelle et al., 1981). A tosse, portanto, constitui um mecanismo alternativo de eliminação das secreções.

Os cílios são prolongamentos citoplasmáticos com estrutura bem definida. Em corte transversal apresentam nove pares de microtúbulos periféricos e um par central (Figura 4). O mecanismo de batimento ciliar é bastante complexo, dependendo basicamente de um deslizamento dos pares de microtúbulos, e ocorre com um grande gasto energético (Satir e Sleight, 1990). Esta estrutura ideal dos cílios pode estar alterada tanto em condições de doenças congênitas (ex: síndrome da hipomotilidade ciliar), assim como resultado de agressões crônicas do epitélio respiratório (Houtmeyers et al., 1999).

FONTE: Modificado de Macchione, 1998.

Figura 4 – A: esquema mostrando detalhes da estrutura em corte transversal do cílio envolto pela membrana plasmática contínua à célula. Neste corte são observados nove pares de microtúbulos conectados entre si por pontes de nexina e dispostos ao redor de um par central. Ao lado podemos ver uma microscopia eletrônica mostrando um corte transversal de cílio de rã, conforme representado no esquema A (aumento de 84000 X).

A frequência de batimento ciliar normal é de 10 a 20 Hz. A eficiência da propulsão do fluido brônquico pelos cílios é conseguida pelo fato do batimento ciliar ser assimétrico. O seu batimento pode ser decomposto em duas fases, na primeira o cílio se estende totalmente e a extremidade do cílio penetra parcialmente na camada gel (fase do batimento efetivo). Em uma segunda fase, de recuperação, o cílio se dobra e coloca o seu eixo principal paralelamente à superfície epitelial. Desta forma, retorna à posição original lentamente, com uma velocidade cerca de duas vezes menor que a do batimento efetivo, por uma fase de menor impedância, sem qualquer contato com a camada gel (Figura 5). O batimento ciliar respeita uma coordenação, onde os cílios se movem em ondas metacrônicas (Lorenzi et al., 1991; Satir e Sleight, 1990).

FONTE: Modificado de Lorenzi Filho, 1993.

Figura 5 – Ciclo do batimento ciliar visto de perfil e do topo da superfície. a: batimento efetivo; b e c: fase de recuperação – o cílio se movimenta lentamente e em direção contrária ao transporte do muco.

A secreção de muco é uma importante atividade biológica, confirmada pelo fato de que ao longo da escala evolucionária serem encontradas células especializadas na sua produção. Em qualquer situação em que seja produzido o muco sua principal função é isolar e proteger a superfície tecidual do ambiente que o cerca.

O muco respiratório exerce as funções de lubrificar e umidificar a superfície das vias aéreas; isolar e proteger o epitélio de agressores exógenos; promover um ambiente adequado ao batimento ciliar e diminuir a tensão superficial nas pequenas vias aéreas de maneira semelhante ao

surfactante nos alvéolos, pois as mesmas tendem a colapsar ao final da expiração (Sadé et al., 1970; Saldiva, 1990; Welsh, 1987). O muco é uma mistura heterogênea de diferentes secreções que formam um polímero hidrofílico com propriedades viscoelásticas. Sua composição é de aproximadamente 95% do seu peso de água; eletrólitos, incluindo Na^+ , o principal componente, K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} e Cl^- , e ainda componentes orgânicos, como proteínas, carboidratos, lipídeos e aminoácidos (Lorenzi-Filho, 1993; Verdugo, 1990).

Como qualquer gel, o muco respiratório consiste em uma matriz e um solvente. Neste caso, o solvente é a água, e a matriz é composta de vários polímeros que se agrupam aleatoriamente. O principal componente desta matriz é uma família de macromoléculas chamadas mucinas e secretadas pelas células mucosas das glândulas da submucosa, células caliciformes e células secretoras. Além das mucinas outras substâncias também se agregam a essa matriz, como os proteoglicanos, lipídeos, substâncias antioxidantes, proteases e antiproteases, tampões, imunoglobulinas (IgA secretora, IgG, IgM), lisozima, peroxidase, lactoferrina, antileucoprotease, proteínas ricas em prolina, albumina, DNA, actina e, possivelmente, outras substâncias como o surfactante (Houtmeyers et al., 1999; Lorenzi-Filho e Saldiva 1991; Verdugo, 1990).

Mucinas são glicoproteínas altamente heterogêneas, consistindo de um filamento protéico e nas quais pequenas cadeias laterais de polissacarídeos estão ligadas. A estrutura central do peptídeo representa aproximadamente 20% do peso, enquanto os 80% restantes são

carboidratos. A estrutura central (“core”) inclui regiões densamente glicosiladas e também regiões “desnudas”, isto é, não glicosiladas. As regiões glicosiladas representam 70 a 80%, enquanto as não glicosiladas representam 20 a 30%, estas contêm resíduos de cisteína e são suscetíveis à clivagem. As cadeias laterais de oligossacarídeos estão ligadas ao corpo protéico central através de ligações O-glicosídicas pela N-acetilgalactosamina nas cadeias laterais de açúcar (Figura 6). As cadeias laterais contêm de 2 a 20 monossacarídios que podem ser lineares ou ramificadas, e variam imensamente na composição. São, em geral, sulfatados e/ou contêm terminais siálicos, determinando as características poliônicas das mucinas (Silberberg, 1990, Verdugo, 1990) (Figura 6).

FONTE: Modificado de Lorenzi Filho, 1993.

Figura 6 – Diagrama esquemático do polímero constituindo um gel. Podemos observar a natureza das ligações entre as cadeias que se encontram entrelaçadas, enquanto as ligações S:S se encontram na estrutura do polímero.

As propriedades físicas dos polímeros no estado gel são primariamente determinadas pela configuração macromolecular na qual as cadeias de polímeros estão interligadas à matriz de gel, assim como pela conformação (tamanho e formato), carga, flexibilidade e concentração dos polímeros constituintes (Houtmeyers et al., 1999; Lopez-Vidriero, 1987).

As mucinas são mantidas nos grânulos das células secretoras graças a um mecanismo de “anteparo”, onde as cargas negativas são contrabalançadas por uma grande quantidade de cargas positivas (no caso, o Ca^{++}). Uma pequena abertura seria suficiente para a entrada de água, difusão do cálcio e exocitose promovida por perda do “anteparo”, por um mecanismo conhecido como “jack-in-the-box” (Figura 7) (Verdugo, 1990).

FONTE: Modificado de Macchione, 1998.

Figura 7 – Representação esquemática do modelo “jack-in-the-box” para a secreção de mucina. O granulo secretor primeiro instala-se junto à membrana plasmática (a). A exocitose é iniciada pela abertura de um poro na membrana (b). A água no espaço extracelular entra através deste orifício, permitindo a difusão do escudo (anteparo) de

cátions. A perda do escudo de carga leva a uma catastrófica reação através da malha dos polímeros sobre a fase de transição, quando então uma carga de repulsão promove uma rápida hidratação da malha poliônica, liberando o produto secretório (c).

Recentes estudos têm também relacionado a secreção de mucinas como resultante de uma resposta à mecanotransdução. Um exemplo seria a observação de que em eventos de compressão mecânica como o que ocorre durante a bronquioconstrição na asma, gradualmente aumentam a expressão da proteína de MUC5AC (expressão gênica de mucina 5AC) nas células (Voynow et al., 2009; Park e Tschumperlin, 2009) (Figura 8).

A compressão mecânica igualmente resultaria no colapso do espaço intercelular, aumentando a concentração de ligantes de EGFR (receptores de fator de crescimento epidérmico). Esta estimulação sinalizada via MAPK (proteína-quinases ativadas por mitógenos) levaria a uma expressão de ligantes específicos de EGFR que retornam a ativação de seus próprios receptores de modo autócrino ou parácrino, perpetuando os sinais, em um ciclo que se mantém mesmo após o término do estímulo de compressão (Chu et al., 2005) (Figura 9).

FONTE: Imagem cedida pela Dra. Mariângela Macchione, modificado de Voynow e Rubin, 2009.

Figura 8 – Regulação da transcrição do MUC5AC. Seguido a um estímulo mecânico, ligantes de EGFR (receptores de fator de crescimento epidérmico) desencadeariam uma cascata de eventos culminando no aumento da expressão da MUC5AC (mucina gene expressão 5AC).

Mas essa regulação da transcrição de sinais não seria a única forma de mecanismo da expressão de mucinas. Vários mediadores inflamatórios, incluindo a elastase neutrofílica, $\text{TNF}\alpha$ (fator de necrose tumoral alfa) e IL-8 (interleucina 8) aumentam igualmente a expressão de MUC5AC (mucina gene expressão 5AC) pelo aumento do RNA (ácido ribonucléico) mensageiro no epitélio das vias aéreas. Alguns estudos também apontam para mecanismos genéticos na regulação da expressão de mucinas (Voynow e Rubin, 2009).

FONTE: Modificado de Chu et al., 2005.

Figura 9 – Mecanismo proposto de ativação autócrina de EGFR (receptores de fator de crescimento epidérmico) em células epiteliais de brônquios após estresse mecânico. Veja texto para maiores detalhes.

A matriz de gel provavelmente é secretada como um polímero condensado, e se torna um hidrogel somente após hidratação. Este mecanismo ocorre por causa da presença de “cross-linking” e do emaranhado existente entre as cadeias de macromoléculas; a matriz do polímero funciona como sua própria membrana semipermeável, impedindo que as cadeias poliônicas migrem para fora do gel. É esta característica poliônica das mucinas que fornecerá a energia necessária para sua hidratação; essa força é contrabalançada pelos íons livres e policações que

podem penetrar na rede de polímeros e neutralizar as cargas poliônicas das mucinas (Lorenzi-Filho e Saldiva, 1991; Verdugo, 1990).

Além das glicoproteínas, os proteoglicanos, polímeros secretados pelas células serosas, também participam da característica viscoelástica do muco. De maneira análoga às mucinas, as lisozimas provavelmente também atuam para a condensação do muco (Verdugo, 1990).

As várias possibilidades de ligações entre os polímeros que compõem o muco respiratório fazem com que possam assumir configurações bastante peculiares quando livres nas vias aéreas. A presença de ligações estáveis, como as pontes dissulfeto e as ligações O-glicosídicas, ao lado de interações iônicas de menor estabilidade, preenchem os requisitos moleculares para a existência de um componente elástico (ligações estáveis) e um deformável, viscoso, representado pelas ligações menos estáveis (King et al., 1974). Esses mesmos autores demonstraram que outras macromoléculas que apresentam “cross-linking” são perfeitamente transportáveis pelo epitélio ciliado. Outros fatores como o grau de hidratação do muco, teor de imunoglobulinas, o pH e a composição iônica também interferem na conformação espacial das moléculas de glicoproteínas e, conseqüentemente em seu comportamento mecânico (King, 1980; Saldiva, 1990).

O comportamento mecânico ideal do muco respiratório é o que prescreve a existência de um componente elástico, capaz de transferir a energia cedida pelo cílio à camada de muco, ao lado de um componente deformável, que pode se alterar e propiciar o deslocamento do filme de

muco diante da energia a ele transmitida e com consequente perda dessa energia (Sleigh et al., 1988).

Portanto, o muco respiratório não pode ser caracterizado somente como um líquido ou um sólido, mas uma combinação de ambos. O sólido responde a uma força com deformação totalmente recuperável após a remoção do “stress”. O líquido se deforma continuamente enquanto durar a força, porém, após sua remoção, o fluxo cessa e não há recuperação desse deslocamento. Por ser um material viscoelástico, a deformação do muco sofre um retardo em relação à força aplicada. A magnitude dessa defasagem indica a proporção do comportamento viscoso e elástico (King, 1980).

O controle da secreção da hipofase sol é de importância fundamental para o correto funcionamento do transporte ciliar, de forma a manter os cílios em contato ideal com a epifase gel. Um aumento da espessura da hipofase sol promoveria o desacoplamento entre o muco e o cílio. Por outro lado, uma hipofase sol de espessura reduzida também levaria a prejuízos do transporte ciliar, por interferência mecânica do cílio no seu retorno à configuração inicial após o batimento efetivo (Satir e Sleigh, 1990; Welsh, 1988) (Figura 10).

FONTE: Modificado de Morgenroth, 1988.

Figura 10 – Muco recobrando o epitélio respiratório. Os cílios estão envoltos pela camada sol (não visualizada) e no topo da figura pode-se ver a camada gel recobrando a camada sol. Eletromicrografia de varredura: 12.000x.

A regulação da quantidade de fluido da hipofase sol depende das células epiteliais (em especial das células ciliadas), que possuem a capacidade tanto de secretar como de absorver líquido, utilizando a energia celular para movimentações iônicas contra um gradiente eletroquímico. As células epiteliais são polarizadas anatômica e funcionalmente, o que é fundamental para que exerçam suas funções (Boucher, 1994a; Boucher, 1994b). Essas células possuem uma membrana apical que se mantém em contato com a luz e uma membrana baso-lateral, que mantém contato com o espaço intersticial e vasos sanguíneos. As células são alinhadas lado a lado e são separadas por um espaço intercelular. Próximo ao ápice o espaço intercelular é estreitado por junções firmes, as “tight junctions”, que determinam uma difusão seletiva do espaço intercelular (Boucher, 1994a;

Boucher, 1994b). O transporte de solutos através de epitélios gera gradientes osmóticos que movimentam a água, o que ocorre aparentemente através dos espaços intercelulares (Welsh, 1988).

Existem dois mecanismos básicos de transporte iônico através do epitélio respiratório: um que determina a capacidade de absorção de líquido e outro oposto, que determina a secreção de líquidos (Boucher, 1994a; Boucher, 1994b; Welsh, 1987).

A absorção de líquidos é efetuada através de um canal específico na membrana apical que facilita a entrada de sódio, a favor do gradiente eletroquímico. Uma vez dentro da célula, o sódio sairá pela membrana basolateral, através da bomba Na-K-ATPase. A passagem do Na^+ provoca um desequilíbrio de cargas, gerando energia para a passagem passiva de Cl^- (Barroso et al., 1992). (Figura 11)

FONTE: Modificado de Wine, 1999.

Figura 11 – Mecanismos de absorção e secreção de íons, água e eletrólitos do epitélio respiratório (TJ: tight-junction).

A secreção de líquidos ocorre a partir de um mecanismo de co-transporte que, ao colocar na membrana basolateral Na^+ a favor de um gradiente eletroquímico, acopla a entrada de K^+ e Cl^- . O Na^+ e o K^+ saem novamente pelo mesmo pólo, através da Na-K-ATPase e por um canal específico para o K^+ , respectivamente. Por outro lado, o Cl^- sai pela membrana apical através de um canal específico de Cl^- (Barroso et al., 1992; Boucher, 1994a; Boucher, 1994b) (Figura 11).

Os canais iônicos, além de regularem a quantidade de líquido na camada sol, provavelmente regulam o grau de hidratação do muco, modulando suas propriedades reológicas (Gastaldi et al., 2000; Verdugo, 1990).

1.4 Hipótese e justificativa

A hipótese do presente estudo baseia-se no fato de que as forças físicas geradas pela ventilação mecânica possam afetar diretamente o desempenho do aparelho mucociliar. Justificamos o desenvolvimento deste estudo baseados no fato de que o impacto da VM sobre esse sistema não está ainda completamente esclarecido na literatura científica. Sendo o aparelho mucociliar um dos mais importantes mecanismos de defesa pulmonar, o conhecimento desse impacto pode trazer repercussões no manejo de pacientes sob ventilação mecânica.

2 OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi avaliar a repercussão das forças envolvidas na ventilação mecânica através de diferentes mecanismos de LPIV sobre o sistema mucociliar pela análise funcional e histopatológica desse aparelho.

3 MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados vinte e sete coelhos da linhagem *Nova Zelândia* (albinos, machos, adultos), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram alimentados e mantidos de acordo com normas já padronizadas, havendo controle de temperatura, umidade e ciclo de luz adequada para essa espécie (Weisbroth, Flatt e Kraus, 1974). Todos os animais foram pesados no início do experimento, a fim de preparar a anestesia e avaliar os valores de ventilação mecânica de acordo com os objetivos do experimento.

Os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos, sendo: seis animais no grupo de baixo volume (BV), onde foi realizada ventilação mecânica com menor volume corrente; oito animais no grupo de lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica por mecanismo de alta pressão (AP); sete animais no grupo de lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica por mecanismo de alto volume corrente (AV) e seis animais para o grupo não-ventilado (Sham).

No início de cada experimento os coelhos receberam medicação pré-anestésica intramuscular composta por Acepromazina (0,1 mg/Kg) e

Cloridrato de Cetamina (2,5 mg/Kg). Após sedação inicial foram obtidos os acessos auriculares (venoso e arterial). Os sinais vitais (oximetria, frequência cardíaca e pressão arterial média) foram monitorados através de monitor Portal DX 2020 (Dixtal Biomédica Indústria e Comércio Ltda – Brasil).

Após anestesia os animais foram posicionados em decúbito dorsal em mesa cirúrgica com foco de luz adequado e então submetidos à traqueotomia, com colocação de cânula de polietileno com diâmetro interno médio de 3,5 mm, ajustada perfeitamente à luz traqueal de maneira que não houvesse vazamentos. A seguir, verificou-se, através da ausculta, se os pulmões estavam ventilando bilateralmente e simetricamente e então a cânula foi fixada à parede da traquéia com o auxílio de fios de algodão 2-0.

Em seguida foi iniciada a manutenção anestésica administrada em bomba de infusão e infundida pelo acesso venoso auricular, sendo composta por Midazolam (0,1 mg/Kg), Cloridrato de Cetamina (1,8 mg/Kg/h), Acepromazina (0,1 mg/Kg/h) e Brometo de Pancurônio (0,2 mg/Kg/h), diluídos em 20 ml de solução fisiológica. O Anexo A exemplifica a planilha utilizada para cálculo do protocolo de anestesia de acordo com o peso de cada animal. Trata-se de protocolo padrão desenvolvido anteriormente pela equipe do LIM 09 - Departamento de Córdio-Pneumologia. Paralelamente um pequeno fragmento da traquéia anterior à cânula de traqueotomia foi retirado para avaliação imediata do transporte mucociliar e da frequência de batimento ciliar naquele tecido biológico.

Para controle de diurese os coelhos foram submetidos à sondagem vesical com utilização de sonda Foley (8 Fr), previamente lubrificada com Cloridrato de Lidocaína a 2%.

3.1 Protocolos de ventilação mecânica

Os animais dos grupos BV, AP e AV foram ventilados inicialmente no modo volume controlado com o ventilador mecânico Newport – Modelo e500 Wave Ventilator (Newport Medical Instruments – Costa Mesa, CA 92627 USA), pelo período de três horas e meia, sendo os trinta minutos iniciais despendidos para a acomodação no ventilador mecânico e estabilização dos sinais vitais (frequência cardíaca de 240 a 300 batimentos por minuto, pressão arterial média ao redor de 70 mmHg, oximetria de pulso acima de 95% e capnometria entre 45% e 35%) (Kozma et al., 1974). Durante os primeiros trinta minutos de ventilação os animais foram ventilados com volume corrente (VC) de 8 ml/kg de peso corpóreo, fluxo de 2 L/min, pressão expiratória final positiva (PEEP) de 5 cmH₂O, frequência respiratória (FR) de 30 rpm e com fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de 40% (Kozma et al., 1974; Broccard et al., 1999; Sinclair et al., 2002; Kotani et al., 2004a; Kotani et al., 2004b; López-Aguilar et al., 2005; Meinhardt et al., 2005). Após esses primeiros trinta minutos para estabilização o protocolo de ventilação específico de cada grupo foi instaurado.

Os coelhos sorteados para o grupo BV foram mantidos no modo volume controlado com volume corrente (VC) de 8 ml/kg de peso corpóreo,

fluxo de 2 L/min, PEEP de 5 cmH₂O, frequência respiratória (FR) de 30 rpm e com fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de 40%. Aqueles sorteados para o grupo AV foram ventilados com VC de 16 ml/kg de peso corpóreo, com fluxo de 2 L/min, PEEP de 5 cmH₂O, FR de 30 rpm e com FiO₂ de 40% ou o necessário para manter SaO₂ mínima de 90%. Os animais sorteados para o grupo AP tiveram o modo ventilatório modificado para pressão controlada e foram ventilados com pressão inspiratória controlada de 30 cmH₂O, PEEP de 12 cmH₂O (ou o suficiente para manter o VC de 8 ml/Kg), FR de 30 rpm e com FiO₂ de 40% ou o necessário para manter uma saturação arterial da oxihemoglobina (SaO₂) mínima de 90%. (Meinhardt et al., 2005; López-Aguillar et al., 2005; Suzuki et al., 2004; Maeda et al., 2004; Simonson et al., 2004; Kotani et al., 2004a; Kotani et al., 2004b; Sinclair et al., 2002; Suh et al., 2002).

Durante o período de ventilação mecânica, em caso de quadro de hipotensão do animal, com pressão arterial média inferior a 50 mmHg, era feita reposição volêmica controlada pelo peso do animal com soro fisiológico a 0,9 %. Os gases inspirados também foram aquecidos e umidificados em sistema de aquecimento de água à temperatura de 33 °C e umidade relativa de 100% (termo higrômetro digital MTH-1380 Minipa Ind. e Com. Ltda – Brasil) durante todo o período de ventilação mecânica (Nakagawa et al., 2000; Nakagawa et al., 2004; Eckerbom et al., 1991).

Foram acompanhados também os valores de gasometria, com coleta de sangue arterial em três tempos, a saber: após os trinta minutos de estabilização no ventilador mecânico, uma hora e meia após instalação do

protocolo de ventilação mecânica e ao final do protocolo de ventilação. Para a realização da gasometria foi coletado 0,5 ml de sangue arterial em seringa preparada (PicoTM 50 - Radiometer Copenhagen) e a análise dos gases sanguíneos foi realizada imediatamente após coleta no aparelho de Gasometria ABL 835 Flex – Radiometer Copenhagen, Dinamarca.

As medidas de mecânica respiratória foram coletadas através do sensor para neonato (CO₂/Flow Sensor Neonatal – Novamatrix Medical Systems Inc. – USA) ligado ao equipamento NICO₂TM – Dixtal. Os sinais analógicos foram gravados imediatamente antes da instalação do protocolo de ventilação mecânica e ao final do experimento, em um microcomputador (Pentium III-600) através de um programa para captação e análise dos dados feito em linguagem LabView 6.0 (National Instruments), desenvolvido especificamente para a monitorização respiratória.

Os animais selecionados para o grupo Sham foram, após procedimento inicial semelhante aos demais grupos relativos à preparação anestésica e traqueotomia, foram ventilados em volume controlado pelo período de 10 minutos com volume corrente (VC) de 8 ml/kg de peso corpóreo, fluxo de 2 L/min, pressão expiratória final positiva (PEEP) de 5 cmH₂O, frequência respiratória (FR) de 30 rpm (Kozma et al., 1974) e com fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de 40%, tempo esse necessário para a coleta de dados vitais e amostra de muco, sendo em seguida sacrificados pelo método de exsanguinação. Os animais dos demais grupos igualmente foram sacrificados pelo método de exsanguinação ao término do período de exposição ao protocolo de ventilação mecânica.

Em seguida ao sacrifício, em todos os grupos os pulmões ainda conectados à cânula de traqueotomia foram mantidos em pressão positiva contínua (CPAP) de 20 cmH₂O e, após remoção em bloco da caixa torácica por esternotomia, o pulmão direito foi clampeado com pinça Kelly imediatamente abaixo da intersecção do brônquio fonte direito com a traquéia, separado do pulmão esquerdo e mergulhado em um Becker com paraformaldeído 4% em tampão fosfato para posterior estudo em microscopia de luz. Um fragmento da traquéia distal foi igualmente mergulhado em paraformaldeído 4% em tampão fosfato para estudo em microscopia de luz. Pequenas porções da traquéia distal foram fixadas com glutaraldeído a 2% para posterior análise em microscopia eletrônica de transmissão e uma pequena amostra também separada para avaliação imediata da função mucociliar (Figura 12).

Figura 12 – Esquema demonstrando as áreas da traquéia dos coelhos onde foram coletadas as amostras de muco e amostras de tecido traqueal para avaliação histopatológica e da função mucociliar.

3.1.1 Critérios para definição de LPIV

Sabe-se que existem basicamente três mecanismos de lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica: volutrauma (pela expansão alveolar secundária ao uso de alto volume corrente, com ou sem alta pressão), atelectrauma (pelo repetitivo recrutamento e não-recrutamento alveolar) e biotrauma (secundário ao aumento de citocinas pela lesão mecânica no tecido pulmonar). No entanto, a contribuição relativa de cada um desses mecanismos ainda não é conhecida e os critérios para definição da LPIV ainda são inespecíficos (Carney et al., 2005; Dreyfuss e Saumon, 1998). Alterações no balanço hídrico, aumento da permeabilidade endotelial e epitelial, além de severos danos teciduais entre outros são descritos na LPIV. Assim, para efeito deste estudo, consideramos como indicativos da ocorrência da lesão induzida pela ventilação mecânica a presença de aumento do número de células polimorfonucleares no parênquima pulmonar, alterações macroscópicas do pulmão, alterações hemodinâmicas e alteração da mecânica respiratória (Dreyfuss e Saumon, 1998; Carney et al., 2005; Wolthuis et al., 2009).

3.2 Avaliação da função mucociliar

As amostras de muco respiratório foram coletadas na traquéia, na porção imediata ao final da cânula de ventilação mecânica, através de um pequeno tubo cilíndrico flexível conectado a uma seringa (Figura 12). Esta

coleta foi efetuada em dois momentos: ao início do protocolo de ventilação mecânica (ou seja, imediatamente após os trinta minutos de estabilização inicial) e ao término da exposição dos animais (ou seja, após mais três horas de ventilação mecânica). Gentilmente, o muco foi aspirado e colocado em um tubo plástico tipo “Eppendorf”, submerso em vaselina líquida para evitar a desidratação, identificado e armazenado em congelador à -70°C, para análise posterior.

3.2.1 Transporte mucociliar *in situ*

O transporte mucociliar *in situ* foi verificado em dois momentos: imediatamente após a traqueotomia um pequeno fragmento da traquéia foi retirado da porção anterior à cânula; ao final do protocolo, a traquéia foi dissecada e uma porção cartilaginosa próxima a Carina foi extraída. Em ambas as situações a velocidade do transporte mucociliar no tecido traqueal foi prontamente avaliada, sendo aquele tecido biológico mantido à temperatura ambiente dentro de uma câmara de acrílico com 100% de umidade, garantida por uma nebulização ultra-sônica de solução salina (NaCl) (Macchione et al., 1995). A velocidade de transporte ciliar foi aferida pela observação direta de carbono coloidal (tinta nanquim filtrada em papel de filtro comum) colocado sobre o epitélio ciliado da traquéia (aproximadamente 1 µl). O deslocamento do “fio” de carbono coloidal pelo percurso de 1,2 mm foi visualizado através de uma lupa estereoscópica (Zeiss) equipada com uma objetiva com aumento de 0,8 vezes, com ocular reticulada e com

aumento de dez vezes. O tempo de progressão também foi cronometrado, sendo o valor final relatado como distância percorrida versus tempo (mm/s) (Rivero et al., 2001).

3.2.2 Frequência do batimento ciliar

Para a mensuração da frequência de batimento ciliar no epitélio da traquéia utilizamos um aparelho composto por uma câmera filmadora (Sony-3CCD - color vídeo câmara), acoplada a um microscópio ótico (Olympus BX 50), sob o qual foi colocada uma pequena porção cartilaginosa da traquéia. Igualmente ao mencionado no item 3.2.1 a frequência do batimento ciliar *in situ* foi verificada em dois momentos. Em ambas as situações a frequência do batimento ciliar no tecido traqueal foi prontamente avaliada pela técnica descrita a seguir. Um estroboscópio emitindo “flashes” de luz a uma frequência inicial de 30.30 Hertz foi direcionado para a superfície do epitélio. A imagem do epitélio, iluminada pela luz estroboscópica e capturada pela câmera filmadora, foi transmitida para um monitor que permitiu, então, uma perfeita observação do epitélio e do batimento ciliar. Observando o epitélio, diminuíamos a frequência da luz estroboscópica até não conseguirmos ver o movimento dos cílios (o equipamento possui um programa de computador que permite controlar a frequência da luz emitida), significando que o batimento ciliar estava em concordância com a frequência da luz emitida pelo estroboscópio. A frequência foi então anotada e o processo repetido por três vezes em áreas diferentes do epitélio.

3.2.3 Transportabilidade pelo método palato de rã

O método de análise de transporte do muco em palato de rã é classicamente aceito como método *in vitro* para determinar a velocidade de transporte do muco em epitélio ciliado (King e Festa, 1998; Rubin et al., 1990b). Utilizando-se hipotermia como anestesia, a *Rana catesbiana* adulta foi rapidamente decapitada, a sua mandíbula foi desarticulada e o palato removido através do corte completo da junção da faringe posterior e esôfago até a pele das costas. O palato removido foi então colocado sobre uma gaze saturada com uma mistura de ringer e água destilada na proporção de 1:1 (Ringer) em um recipiente de vidro, vedado com um filme plástico e então armazenado em refrigerador a 4°C por dois dias. No terceiro dia uma amostra de muco foi coletada através da extremidade posterior do palato com estilete e imediatamente imerso em óleo mineral para evitar a desidratação. Todos os experimentos foram realizados a partir do terceiro dia para a máxima remoção do muco da rã, mantendo-se a integridade da atividade ciliar (Macchione et al., 1995; Rubin, 1998). Este muco foi então coletado para servir como controle, em relação ao muco a ser testado. Durante os procedimentos o palato de rã foi mantido à temperatura ambiente, dentro de uma câmara de acrílico, com 100% de umidade garantida por uma nebulização ultra-sônica de solução salina a 1:2 diluída em água (0,45% ringer) (Macchione et al., 1995). A velocidade de transporte ciliar foi aferida pela colocação de uma amostra de muco da própria rã (cerca de cinco μ l) sobre o epitélio ciliado do palato de rã e pela observação de seu deslocamento. Este mesmo

procedimento foi efetuado com idêntica quantidade de amostra de muco dos coelhos. Em ambos os casos o deslocamento foi visualizado através de uma lupa estereoscópica (Zeiss) equipada com uma objetiva com aumento de 0,8 vezes com ocular reticulada e com aumento de dez vezes. Através da ocular reticulada, foi medido o deslocamento do muco na direção céfalo-caudal do palato (6 mm) e seu tempo cronometrado (Figura 13).

FONTE: Modificado de Nakagawa, 1997 – com permissão.

Figura 13 – Representação esquemática do transporte mucociliar em palato de rã. 1: lupa estereoscópica com objetiva e ocular reticulada; 2: fonte de luz externa; 3: suporte de vidro para o palato e rã; 4: nebulizador ultra-sônico; 5: câmara de acrílico; 6: palato de rã.

Foram cronometrados cinco deslocamentos para cada amostra, intercalando-se as medidas do muco dos coelhos com o muco da rã, de

forma a detectarmos possível deteriorização do palato. O resultado final está expresso em termos relativos, comparando-se a velocidade do muco teste (de coelhos) com a velocidade do muco da própria rã (Albertini-Yagi, 2005).

3.2.4 Ângulo de contato

Pela medida do ângulo de contato se obtém o grau de “wettabilidade” (parâmetro de hidratação da amostra). O ângulo de contato é formado entre a interface ar-líquido e a horizontal (Puchelle et al., 1987).

FONTE: Modificado de Nakagawa, 1997 – com permissão.

Figura 14 – Representação esquemática do equipamento utilizado para a medida do ângulo de contato.

NOTA: 1: lupa com goniômetro e braço articulado; 2: fonte de luz externa; 3: câmara de acrílico; 4: suporte de ferro

temperado perfurado; 5: reservatório de água em banho-maria; 6: amostra de muco e medida do ângulo de contato.

O aparelho de mensuração do ângulo de contato é formado por uma lupa com braço articulado para movê-la no sentido lateral, para frente e para trás. A lupa tem capacidade de aumento de 25 vezes e sua ocular possui um goniômetro com escala de zero a 180 graus (Figura 14).

As amostras de muco dos coelhos foram depositadas em uma lâmina tratada anteriormente com solução sulfocrômica para retirada de cargas elétricas que interferem na medida do ângulo. As mensurações foram realizadas da seguinte maneira: foi colocada uma pequena amostra de muco de aproximadamente 5 μ l em éter de petróleo, e em seguida esta amostra foi colocada sobre a lâmina tratada, com ajuda de um estilete. A lâmina foi posicionada sobre um suporte de ferro temperado, com furos, e este, por sua vez, em banho-maria à temperatura de 37° C sendo a amostra de muco protegida com uma pequena câmara de acrílico. Tais procedimentos visaram impedir a desidratação do muco por exposição ao ar ambiente e à luz artificial. A mensuração foi efetuada utilizando-se o goniômetro, sendo medido o ângulo formado entre a gota de muco e a superfície da lâmina (Albertini-Yagi, 2005).

3.3 Morfometria e morfologia

3.3.1 Infiltrado inflamatório

O pulmão direito já fixado com paraformaldeído 4% em tampão fosfato, pH 7,0, por 24 horas, foi dissecado sendo retiradas uma porção de aproximadamente 2 cm x 1 cm do lobo médio região anterior e outra do lobo inferior região póstero-basal (região não-dependente e região dependente, respectivamente) (West, 2002). Estes fragmentos foram desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizados em xilol e emblocados em parafina. Em seguida foram obtidos cortes de 5µm (em micrótomo Leica RM2065). Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (100° a 70°) e água e corados durante 2 minutos pela Hematoxilina de Harris. Os cortes foram então lavados em água corrente e contracorados com eosina durante quinze minutos; a seguir, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (95° e 100°), diafanizados em xilol e montados com lamínula e *entellan* para análise das alterações histopatológicas referentes a processo inflamatório, sendo quantificado o número de polimorfonucleares com auxílio do programa de análises de imagens digitais Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA) acoplado a um microscópio de luz Nikon Opitphot, com aumento de 400 vezes (objetiva 40x e ocular 10x).

Foram estudados preparados histológicos provenientes de seis animais do grupo Sham, seis do grupo BV, oito do grupo AP e sete do grupo

AV. Em cada corte histológico foram obtidas imagens digitais de 10 campos aleatórios de alta qualificação (400x) do parênquima pulmonar (com área de 72.900 μm^2 cada campo, contendo 225 pontos) evitando-se área de brônquios e vasos. A área de parênquima foi determinada pela técnica de contagem de pontos. O número de células polimorfonucleares contabilizadas por área de parênquima foi expresso em número de células polimorfonucleares por μm^2 de área de parênquima pulmonar.

3.3.2 Muco ácido e muco neutro

O pulmão direito já fixado com paraformaldeído 4% em tampão fosfato, pH 7,0, por 24 horas, foi dissecado sendo retiradas uma porção de aproximadamente 2 cm x 1 cm do lobo médio região anterior e do lobo inferior região pósterio-basal (região não-dependente e região dependente, respectivamente) (West, 2002). Um pequeno fragmento da traquéia distal igualmente foi fixada com paraformaldeído 4% em tampão fosfato, pH 7,0, por 24 horas. Esses tecidos biológicos foram desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizados em xilol e emblocados em parafina. Em seguida foram obtidos cortes de 5 μm (em micrótomo Leica RM2065).

A quantificação e o perfil histoquímico da secreção de muco nos bronquíolos terminais e na traquéia dos coelhos foram avaliados através da coloração dos cortes histológicos em ácido periódico de Schiff e Alcian blue (PAS/AB). Esta coloração permite-nos diferenciar as mucinas ácidas e neutras. Desta forma, as glicoproteínas neutras exibem uma coloração

avermelhada e as ácidas, um tom que varia do azul ao roxo (Caruso, 2000; Mori, 1999; Costa, 2002). Foram estudados preparados histológicos do pulmão e da traquéia distal provenientes de seis animais do grupo Sham, seis do grupo BV, oito do grupo AP e sete do grupo AV. Em cada corte histológico foram obtidas imagens digitais de 10 campos da traquéia e uma média de cinco campos dos bronquíolos terminais. Para o estudo da traquéia utilizou-se um sistema teste de 324 pontos por campo, com uma área por ponto de $96,1 \mu\text{m}^2$. Nos bronquíolos utilizou-se um sistema teste de 570 pontos por campo, com uma área por ponto de $39,4 \mu\text{m}^2$.

Determinou-se a quantidade de pontos sobrepostos sobre o epitélio com muco ácido (tons de azul), sobre o epitélio com muco neutro (tons avermelhados) e sobre o epitélio com muco misto (presença de grânulos de muco com sobreposição de tons azulados e avermelhados). As áreas de muco ácido, muco neutro, muco misto e epitélio sem muco foram calculadas pelas relações:

$$\frac{\text{Nº de pontos em muco ácido}}{\text{Área do ponto em } \mu\text{m}^2} \times \text{Área do ponto em } \mu\text{m}^2 = \text{Área de muco ácido}$$

$$\frac{\text{Nº de pontos em muco neutro}}{\text{Área do ponto em } \mu\text{m}^2} \times \text{Área do ponto em } \mu\text{m}^2 = \text{Área de muco neutro}$$

$$\frac{\text{Nº de pontos em muco misto}}{\text{Área do ponto em } \mu\text{m}^2} \times \text{Área do ponto em } \mu\text{m}^2 = \text{Área de muco misto}$$

$$\frac{\text{Nº de pontos em epitélio sem muco}}{\text{Área do ponto em } \mu\text{m}^2} \times \text{Área do ponto em } \mu\text{m}^2 = \text{Área de epitélio sem muco}$$

A área de muco total foi representada pela somatória da área de muco ácido, muco neutro e muco misto.

Os parâmetros: muco ácido, muco neutro e muco total (em área) foram então divididos pela área de epitélio total para comparação entre grupos (relação muco por área de parênquima) (Camargo Pires-Neto et al., 2006).

A área total do epitélio traqueal e de bronquíolos pode ser calculada pela relação:

$$\begin{array}{rcl}
 \text{Área de muco ácido} & & \\
 + & & \\
 \text{Área de muco neutro} & & \\
 + & & \\
 \text{Área de muco misto} & = & \text{Área total do epitélio} \\
 + & & \\
 \text{Área de epitélio sem muco} & &
 \end{array}$$

Foi também mensurada a espessura do epitélio traqueal e de bronquíolos de cada campo estudado pela relação:

$$\begin{array}{rcl}
 \text{Comprimento de membrana linear} & & \\
 \times & = & \text{Espessura do Epitélio} \\
 \text{Área total do epitélio} & &
 \end{array}$$

3.3.3 Microscopia eletrônica

Os pequenos fragmentos (1 mm x 1 mm) de traquéia distal fixados em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato de sódio e potássio 0,15M, pH 7,2, foram processados segundo rotina do Centro Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP.

Para avaliação qualitativa da integridade celular do epitélio traqueal, foram verificados preparados da traquéia distal provenientes de animais do grupo Sham, grupo BV, grupo AP e grupo AV.

Os espécimes foram estudados e micrografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI – modelo TECNAI 10 acoplado ao software AnalySIS Image Processing.

3.4 Análise estatística

Todos os dados analisados foram previamente submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov.

Para comparação de dados clínicos e infiltrado inflamatório entre grupos (incluindo Sham), balanço hídrico, dados de mecânica respiratória (somente nos grupos ventilados) e espessura do epitélio traqueal e de bronquíolos distais em todos os grupos, utilizamos a *ANOVA* e *post hoc* análise com o teste de Tukey. Os resultados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão.

Para estudar o transporte mucociliar na traquéia de coelho, transportabilidade em palato de rã, frequência de batimento ciliar e ângulo de contato (somente grupos ventilados), optou-se pelo teste *Wilcoxon Signed Ranks Test*, com comparações estatísticas intra-grupo considerando-se o momento inicial e final da exposição à ventilação mecânica. A verificação dos dados entre os grupos foi realizada pelo Kruskal-Wallis. Os valores foram apresentados como mediana e amplitude interquartil.

Os dados referentes ao muco ácido e muco neutro em traquéia e bronquíolos foram analisados através de análise Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney. Os valores estão apresentados como mediana e percentil.

A significância estatística adotada foi de $p < 0,05$. Os resultados foram gerados através do SPSS para Windows® versão 15.0.

4 RESULTADOS

4.1 Ventilação e sinais vitais

Dados clínicos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Sinais vitais

<i>Variável</i>	<i>Sham</i>	<i>BV</i>	<i>AV</i>	<i>AP</i>	<i>p</i>
Peso	2.765 ± 161	3.373 ± 197	3.368 ± 146	3.426 ± 354	<i>ns</i>
Pressão Média ^a	62,0 ± 5,1	71,5 ± 21,5	64,6 ± 11,1	60,6 ± 11,2	<i>ns</i>
Pressão Média ^b		54,0 ± 26,4	59,4 ± 9,1	47,9 ± 8,0	<i>ns</i>
FC ^a	232,7 ± 14,2	242,3 ± 7,8	234,9 ± 21,1	231,5 ± 18,9	<i>ns</i>
FC ^b		258,3 ± 37,1*	198,7 ± 38,8*	219,6 ± 29,4	0,019*
Diurese ^b		133,3 ± 87,6	250,0 ± 141,4	196,4 ± 315,3	<i>ns</i>
Fluidos ^b		302,0 ± 26,8	421,7 ± 134,5	506,7 ± 229,4	<i>ns</i>
pH ^a	7,4 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,5 ± 0,1	7,4 ± 0,1	<i>ns</i>
pH ^b		7,4 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,3 ± 0,1	<i>ns</i>
Lac ^a	5,0 ± 0,76	2,4 ± 1,31	3,7 ± 1,25	3,0 ± 1,51	<i>ns</i>
Lac ^b		4,7 ± 2,00*	8,4 ± 3,06*	6,5 ± 2,19	0,04*
Bic ^a	20,7 ± 2,45	19,6 ± 3,71	21,3 ± 3,11	20,8 ± 3,36	<i>ns</i>
Bic ^b		15,6 ± 3,24	11,0 ± 2,68	14,5 ± 4,76	<i>ns</i>

Valores iniciais^a e finais^b (média ± desvio padrão). Pressão média expressa em mmHg, Frequência Cardíaca (FC) em batimentos por minuto, Diurese e Fluidos administrados em mililitros (*durante protocolo*), Lactato (Lac) e Bicarbonato (Bic) em mmol/L.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros ventilatórios dos grupos Baixo Volume, Alto Volume e Alta Pressão.

Tabela 2 – Parâmetros ventilatórios

<i>Variável</i>	<i>BV</i>	<i>AV</i>	<i>AP</i>	<i>p</i>
FiO ₂ ^a	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	<i>ns</i>
FiO ₂ ^b	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1	<i>ns</i>
SaO ₂ ^a	97,7 ± 3,0	98,4 ± 1,6	97,4 ± 1,9	<i>ns</i>
SaO ₂ ^b	97,8 ± 1,0	97,0 ± 2,3	96,6 ± 6,5	<i>ns</i>
EtCO ₂ ^a	26,0 ± 4,1	26,8 ± 2,9	27,6 ± 9,8	<i>ns</i>
EtCO ₂ ^b	24,0 ± 5,5	14,5 ± 3,1	27,6 ± 16,2	<i>ns</i>
PaCO ₂ ^a	31,5 ± 8,41	31,0 ± 11,28	33,3 ± 13,04	<i>ns</i>
PaCO ₂ ^b	28,6 ± 12,35*	16,3 ± 2,51*/**	29,9 ± 9,27**	0,054* 0,026**
PaO ₂ ^a	191,8 ± 18,54	168,6 ± 43,15	163,8 ± 48,88	<i>ns</i>
PaO ₂ ^b	160,8 ± 49,54	162,2 ± 46,23	155,7 ± 52,85	<i>ns</i>

Valores iniciais^a e finais^b (média ± desvio padrão).
FiO₂ e SaO₂ expressos em porcentagem, EtCO₂, PaCO₂ e PaO₂ em mmHg.

A Tabela 3 apresenta os valores obtidos na ventilação mecânica.

Tabela 3 – Ventilação mecânica (VM)

<i>Variável</i>	<i>BV</i>	<i>AV</i>	<i>AP</i>	<i>p</i>
Vt ^a	28,2 ± 5	35,1 ± 6	30,2 ± 7	ns
Vt ^b	27,8 ± 5	54,8 ± 8	27,7 ± 6	0,000†
Ppico ^a	16,3 ± 2	19,1 ± 1	16,4 ± 2	ns
Ppico ^b	17,4 ± 1	27 ± 3	30 ± 1	0,000†
Pmédia ^a	8,6 ± 0,6	9,7 ± 2	8,8 ± 1	ns
Pmédia ^b	8,7 ± 0,5	11,6 ± 1	19,6 ± 3	0,000†
Pplat ^a	16,1 ± 2	18,5 ± 1	16,1 ± 2	ns
Pplat ^b	16,9 ± 1	26,3 ± 3	29,4 ± 1	0,000†
Fluxo ^a	2,7 ± 0,6	3,4 ± 0,4	5,1 ± 3	ns
Fluxo ^b	2,6 ± 0,4	4,8 ± 0,8	8,6 ± 1	0,000†
PEEP ^a	5,3 ± 0,05	5,4 ± 0,1	5,3 ± 0,04	ns
PEEP ^b	5,3 ± 0,03	5,3 ± 0,06	11,9 ± 2,66	0,000†
R _{ti} ^a	45,2 ± 9,4	45,2 ± 7,1	52,8 ± 15,6	ns
R _{ti} ^b	59,8 ± 12,9	52,4 ± 7,8	64,5 ± 25,4	ns
C _{dyn} ^a	2,9 ± 0,3	3 ± 0,6	3,3 ± 0,9	ns
C _{dyn} ^b	2,9 ± 0,6*	3,1 ± 0,6**	1,6 ± 0,3*/**	0,001*/0,000**

Valores iniciais^a e finais^b (média ± desvio padrão).

Vt expresso em mililitros, Ppico, Pmédia e Pplat em cmH₂O, Fluxo em litros por minuto, PEEP em cmH₂O, R_{ti} em cmH₂O/L/seg e C_{dyn} em ml/cmH₂O. † Entre grupos.

Informações individuais do peso dos animais bem como dos dados ventilatórios e fisiológicos mensurados no início e ao final dos diferentes protocolos de ventilação mecânica estão apresentados nos Anexos F, G1 e G2.

4.2 Efeitos da ventilação mecânica sobre o pulmão

4.2.1 Avaliação macroscópica

A aparência macroscópica dos pulmões foi observada imediatamente após a abertura da caixa torácica. Os pulmões do grupo Sham e BV tinham aparência normal, sem hemorragia, atelectasias ou áreas de consolidação. Os pulmões dos animais do grupo AV apresentavam algumas pequenas áreas de lesões hemorrágicas bem como áreas localizadas de atelectasias, porém sem grandes áreas de consolidação. Já no grupo AP foram observadas grandes áreas de consolidação hemorrágica (Figura 15).

Figura 15 – Análise macroscópica de pulmões de coelhos. O aspecto dos pulmões dos grupos Sham e BV foi semelhante (A). Os pulmões dos grupos AV (B) e AP (C) apresentaram alterações macroscópicas expressivas.

4.2.2 Infiltrado inflamatório

A Tabela 4 apresenta uma comparação do número de células polimorfonucleares por área de parênquima pulmonar (μm^2) entre os grupos expostos aos protocolos de ventilação mecânica e o grupo Sham. O Gráfico 1 apresenta visualmente esta relação.

Tabela 4. – N° de células polimorfonucleares por área de parênquima pulmonar (μm^2)

<i>Grupos</i>	<i>N° de Polimorfonucleares</i>	<i>p</i>
BV	1,61 ($\pm 0,36$)	*
AV	1,36 ($\pm 0,50$)	*
AP	1,28 ($\pm 0,35$)	*
Sham	0,65 ($\pm 0,14$)	

Grupos: Baixo Volume (BV), Alto Volume (AV), Alta Pressão (AP) e Sham. Os valores representam a média do número de células polimorfonucleares por fração de parênquima $\pm$ DP. * $p < 0,001$ em relação ao grupo Sham.

Gráfico 1 – Número de células polimorfonucleares (infiltrado inflamatório) observado em parênquima pulmonar dos animais do grupo Sham e grupos expostos aos protocolos de VM (Baixo Volume/BV, Alto Volume/AV e Alta Pressão/AP).

Na Figura 16 apresentamos uma representação ilustrativa do parênquima pulmonar dos grupos Sham, BV, AV e AP respectivamente.

Figura 16 – Parênquima pulmonar dos grupos: Sham (A), Baixo Volume (B), Alto Volume (C) e Alta Pressão (D) - (HE 400x). As setas apresentam exemplos de células polimorfonucleares. Barra = 100µm.

4.2.3 Lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica

Segundo os critérios para definição da ocorrência da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica, previamente estabelecidos no item 3.1.1, todos os grupos ventilados apresentaram alterações em relação ao grupo Sham. O grupo ventilado a menor volume corrente apresentou alterações relativas ao aumento do infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar. O grupo Alto Volume apresentou alterações macroscópicas do pulmão, alterações hemodinâmicas e um aumento do número de células polimorfonucleares no parênquima pulmonar. O grupo Alta Pressão além do aumento de polimorfonucleares em parênquima pulmonar, alterações macroscópicas do pulmão e alterações hemodinâmicas, apresentou também alterações de mecânica respiratória.

4.3 Função mucociliar

Os dados de função mucociliar estão representados nas Tabelas 5, 6, 7 e 8. Cada tabela é seguida de um gráfico proporcionando a representação visual das alterações observadas na função mucociliar dos grupos ventilados, no intervalo compreendido antes e após a exposição aos diferentes protocolos de ventilação mecânica (Gráficos 2, 3, 4 e 5). Os Anexos B, C, D e E apresentam os valores individuais dos resultados obtidos na análise de transporte *in situ* na traquéia de coelhos, transporte *in vitro* em palato de rã, frequência de batimento ciliar e medida do ângulo de contato.

Tabela 5 –Transportabilidade em traquéia de coelho (TMCT)

	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>p</i>
BV	0,0058 (0,0070 - 0,0042)	0,0080 (0,0088 - 0,0063)	0,273
AV	0,0056 (0,0058 - 0,0047)	0,0083 (0,0090 - 0,0049)	0,116
AP	0,0073 (0,0086 - 0,0060)	0,0138 (0,0158 - 0,0080)	0,075
	$p=0,029$		

Grupos: Baixo Volume (BV), Alto Volume (AV) e Alta Pressão (AP). Transportabilidade em traquéia (TMCT) expressa em mm/s. Os valores representam a mediana, e os números entre parênteses representam a amplitude interquartil.

Gráfico 2 – Reprodução gráfica da transportabilidade do muco *in situ* (traquéia de coelho) nos grupos ventilados (Baixo Volume/BV, Alto Volume/AV e Alta Pressão/AP).

NOTA: Os valores estão expressos em velocidade percorrida versus tempo (milímetros por segundo). Os valores iniciais antecedem o protocolo de ventilação e os valores finais sucedem a exposição dos animais à ventilação mecânica. Não foi observada diferença estatística intra-grupo. Entre os grupos a diferença estatística dos valores iniciais ($p=0,029$) não permitiu a comparação após aplicação dos diferentes protocolos de VM. Representação dos dados em mediana e quartil.

Tabela 6 – Transportabilidade em palato de rã (TMC)

	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>p</i>
BV	1,42 (2,11 – 0,99)	0,95 (1,15 – 0,92)	0,007
AV	1,23 (1,81 – 0,76)	1,01 (1,44 – 0,81)	0,139
AP	1,18 (1,48 – 0,98)	1,01 (1,16 – 0,68)	0,059
	<i>p</i> =0,419	<i>p</i> =0,461	

Grupos: Baixo Volume (BV), Alto Volume (AV) e Alta Pressão (AP). Transportabilidade em palato (TMC) expressa em velocidade relativa (muco coelho/muco rã). Os valores representam a mediana, e os números entre parênteses representam a amplitude interquartil.

Gráfico 3 – Reprodução gráfica da transportabilidade do muco *in vitro* (palato de rã) nos grupos ventilados (Baixo Volume/BV, Alto Volume/AV e Alta Pressão/AP).

NOTA: Os dados estão expressos em valores relativos (velocidade muco do coelho versus velocidade muco da rã). Os valores iniciais antecedem o protocolo de ventilação e os valores finais sucedem a exposição dos animais à ventilação mecânica. Entre os grupos não há significância estatística antes e após exposição aos diferentes protocolos de VM. Representação dos dados em mediana e quartil.

Tabela 7 – Frequência de batimento ciliar (FBC)

	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>p</i>
BV	12,82 (13,69 – 11,23)	14,92 (16,02 – 11,36)	0,123
AV	12,34 (12,98 – 12,04)	13,51 (14,81 – 11,90)	0,100
AP	13,51 (14,49 – 11,62)	11,69 (14,18 – 10,12)	0,047
	<i>p</i> =0,223	<i>p</i> =0,103	

Grupos: Baixo Volume (BV), Alto Volume (AV) e Alta Pressão (AP). Frequência de batimento ciliar (FBC) expressa em Hertz (Hz). Os valores representam a mediana, e os números entre parênteses representam a amplitude interquartil.

Gráfico 4 – Reprodução gráfica da frequência de batimento ciliar observada na traquéia de coelho nos grupos ventilados (Baixo Volume/BV, Alto Volume/AV e Alta Pressão/AP).

NOTA: Os valores estão expressos em Hertz. Os valores iniciais antecedem o protocolo de ventilação e os valores finais sucedem a exposição dos animais à ventilação mecânica. Entre os grupos não há significância estatística antes e após exposição aos diferentes protocolos de VM. Representação dos dados em mediana e quartil.

Tabela 8 – Ângulo de contato (AC)

	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>p</i>
BV	28,0 (30,3 – 25,0)	35,0 (37,0 – 28,5)	0,131
AV	24,5 (30,5 – 20,5)	32,0 (33,8 – 28,3)	0,400
AP	29,0 (33,8 – 22,0)	35,0 (36,0 – 26,0)	0,285
	<i>p</i> =0,467	<i>p</i> =0,795	

Grupos: Baixo Volume (BV), Alto Volume (AV) e Alta Pressão (AP). Ângulo de contato (AC) expresso em graus. Os valores representam a mediana, e os números entre parênteses representam a amplitude interquartil.

Gráfico 5 – Reprodução gráfica da medida do ângulo de contato do muco dos animais dos grupos ventilados (Baixo Volume/BV, Alto Volume/AV e Alta Pressão/AP).

NOTA: Os valores estão expressos em graus. Os valores iniciais antecedem o protocolo de ventilação e os valores finais sucedem a exposição dos animais à ventilação mecânica. Entre os grupos não há significância estatística antes e após exposição aos diferentes protocolos de VM. Também não foi verificada diferença estatística significativa na análise intra-grupo. Representação dos dados em mediana e quartil.

4.3.1 Muco ácido e muco neutro

4.3.1.1Traquéia

A Tabela 9 apresenta a área de muco ácido, muco neutro e muco total (em μm^2), observada na traquéia dos animais nos grupos ventilados e grupo Sham. O Gráfico 6 apresenta a relação entre as áreas de muco ácido, muco neutro e muco total e o epitélio total observado na traquéia dos animais entre os grupos ventilados e grupo Sham.

Tabela 9 – Muco em traquéia de coelhos (em μm^2)

		Percentil			p
	Grupos	25%	50%	75%	
Muco Total	Sham	2546,6	4660,8	6342,6	<0,05*
	BV	1441,5	2018,1	3075,2	<0,05*
	AV	2066,1	3219,3	4324,5	<0,05**
	AP	2162,2	2883,0	3892,0	<0,05**
Muco Neutro	Sham	1057,1	1585,6	2738,8	0,000†
	BV	384,4	672,7	1057,1	0,000*
	AV	961,0	1633,7	3603,7	0,000†
	AP	1345,4	1729,8	2306,4	0,000†
Muco Ácido	Sham	720,7	1873,9	2786,9	0,000*
	BV	384,4	672,7	1153,2	<0,05*
	AV	0	240,2	1057,1	<0,05**
	AP	192,2	480,5	864,9	<0,05**

Grupos: Baixo Volume (BV), Alto Volume (AV) e Alta Pressão (AP). O percentil 50% representa a mediana. † Em relação ao grupo BV, * Em relação aos demais grupos, ** Em relação aos grupos BV e Sham.

Gráfico 6 – Relação área de muco/fração de parênquima observada no epitélio traqueal dos grupos Sham, Baixo Volume (BV), Alto Volume (AV) e Alta Pressão (AP).

NOTA: * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos, ** $p < 0,05$ em relação aos grupos BV e AP, † $p < 0,05$ em relação aos grupos BV e Sham, †† $p < 0,05$ em relação ao grupo BV, ‡ $p < 0,05$ em relação aos grupos AP e Sham. Valores em mediana e quartil.

Na Figura 17 há uma representação ilustrativa do muco observado no epitélio traqueal dos grupos Sham, Baixo Volume, Alto Volume e Alta Pressão respectivamente.

Figura 17 – Muco observado no epitélio traqueal dos grupos: Sham (A), Baixo Volume (B), Alto Volume (C) e Alta Pressão (D) - (PAS/AB 400x).

NOTA: As setas pretas contínuas apresentam exemplos de muco neutro, as setas brancas contínuas apresentam exemplos de muco ácido, as setas brancas pontilhadas apontam a presença de células polimorfonucleares no epitélio e as setas pretas pontilhadas apontam para espaços vazios antes ocupados por muco. Barra = 100µm.

Quanto à espessura do epitélio traqueal em μm^2 , houve uma diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) nos animais do grupo BV ($28,7 \pm 9,6$) e AP ($35,9 \pm 10,6$) quando comparados com os grupos Sham ($42,1 \pm 9,7$) e AV ($39,5 \pm 10,0$). Esta diminuição foi mais significativa no grupo BV quando isoladamente comparado com o grupo AP ($p=0,002$) (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Espessura do epitélio traqueal de coelhos nos grupos Sham e grupos ventilados (Baixo Volume/BV, Alto Volume/AV e Alta Pressão/AP).

NOTA: Valores apresentados em Média $\pm$ Desvio Padrão. * $p<0,05$ comparando com Sham e AV; ** $p=0,002$ comparando com AP.

4.3.1.2 Bronquíolos

A Tabela 10 apresenta a área de muco ácido, muco neutro e muco total (em μm^2), observada em bronquíolos distais nos grupos ventilados e no grupo Sham. O Gráfico 8 apresenta a relação entre as áreas de muco ácido, muco neutro e muco total e o epitélio total observado nos bronquíolos distais dos animais entre os grupos ventilados e grupo Sham.

Tabela 10 – Muco em bronquíolos de coelhos (em μm^2)

		Percentil			p
	Grupos	25%	50%	75%	
Muco Total	Sham	472,8	748,6	1122,9	0,000†
	BV	236,4	394,0	807,7	0,000*
	AV	472,8	768,3	1241,1	<0,05**
	AP	354,6	591,0	886,5	<0,05***
Muco Neutro	Sham	433,4	709,2	1044,1	0,000†
	BV	197,0	394,0	571,3	0,000*
	AV	433,4	709,2	1004,7	<0,05**
	AP	295,5	571,3	866,8	<0,05***
Muco Ácido	Sham	0	0	0	ns
	BV	0	0	0	ns
	AV	0	0	0	ns
	AP	0	0	0	ns

Grupos: Baixo Volume (BV), Alto Volume (AV) e Alta Pressão (AP). O percentil 50% representa a mediana. † Em relação ao grupo BV, * Em relação aos demais grupos, **Em relação aos grupos BV e AP, *** Em relação aos grupos BV e AV.

Gráfico 8 – Área de muco observada no epitélio de bronquíolos de coelhos nos grupos Sham, Baixo Volume (BV), Alto Volume (AV) e Alta Pressão (AP).

NOTA: * $p < 0,05$ comparando com os demais grupos. Valores em mediana e quartil.

Na Figura 18 visualiza-se uma representação ilustrativa do muco observado no epitélio de bronquíolos dos grupos Sham, BV, AV e AP respectivamente.

Figura 18 – Muco observado no epitélio de bronquíolos dos grupos: Sham (A), Baixo Volume (B), Alto Volume (C) e Alta Pressão (D) - (PAS/AB 400x).

NOTA: As setas pretas apresentam exemplos de muco neutro e a seta branca, exemplo de muco ácido. Barra = 100µm.

Quanto à espessura do epitélio dos bronquíolos, houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) nos animais dos grupos AV ($10,3 \pm$

0,4) e AP ($10,8 \pm 0,6$) em comparação com os grupos Sham ($8,7 \pm 0,4$). O grupo BV ($10,2 \pm 0,6$) não se diferenciou dos demais grupos (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Espessura do epitélio de bronquíolos de coelhos nos grupos Sham, BV, AV e AP (Média e Desvio Padrão).

NOTA: * $p < 0,05$ comparando com Sham.

4.3.2 Microscopia eletrônica

A Figura 19 (sequências A, B, C e D) apresenta as fotos de microscopia eletrônica dos grupos Sham, Baixo Volume, Alto Volume e Alta Pressão respectivamente.

Figura 19 – Microscopia eletrônica do epitélio de revestimento da traquéia (próxima a região da Carina) dos grupos Sham (A), Baixo Volume (B), Alto Volume (C) e Alta Pressão (D) mostrando cílios (setas pretas), inserção de cílios (setas brancas), mitocôndrias (asteriscos), vesículas (cabeça de seta branca), região de perda ciliar (cabeça de seta preta), microvilos (setas pontilhadas) e região de junção celular (áreas pontilhadas). A: aumento de 1850x; B, C e D: aumento de 3700 x. Barra = 5µm

Embora não tenham sido realizados estudos quantitativos nos preparados processados para microscopia eletrônica, a análise ultra-

estrutural forneceu resultados interessantes. Não foram observadas alterações na estrutura ciliar e na inserção (ancoramento) dos cílios no grupo Sham e nos grupos Baixo Volume, Alto Volume e Alta Pressão. Aparentemente, existe uma menor quantidade de microvilos no grupo AP em comparação com os demais grupos. Não há sugestão de diminuição da quantidade de mitocôndrias nos grupos Sham, BV e AV. Estas organelas são de difícil visualização no grupo AP. Também não foram observadas alterações nas junções celulares nos grupos Sham, BV e AV. Já no grupo AP observamos uma indefinição visual do complexo juncional (Figura 19 D).

Diferentemente dos grupos Sham e BV, o citoplasma das células epiteliais ciliadas da traquéia dos animais dos grupos AV e AP apresentaram-se repletas por grande quantidade de vesículas. Também nos grupos AV e AP há indícios de ocorrência de edema intracelular, devido ao surgimento de áreas opticamente vazias no citoplasma pelo afastamento das organelas entre si.

Ainda no grupo alta pressão foi possível encontrar algumas áreas de ruptura da membrana plasmática apical, com consequente perda ciliar (Figura 19 D).

5 DISCUSSÃO

Estudos clínicos e experimentais têm reportado repetidas vezes a possível ocorrência da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica. Fatores dinâmicos que estão presentes na VM como forças de tensão e de cisalhamento, e a abertura e fechamento cíclicos das vias aéreas (Maeda et al., 2004), têm sido apresentados como importantes mecanismos de lesão pulmonar (Conrad et al., 2005; Bersten e Bryan, 2005). Em casos extremos, se determinada força é aplicada no pulmão até o seu limite de ruptura, as estruturas pulmonares como capilares e paredes alveolares são destruídas (Gattinoni et al., 2003). Como na literatura científica as informações do risco potencial da LPIV sobre diferentes sistemas ainda são escassas, o objetivo do nosso trabalho foi, portanto, o de avaliar sua repercussão sobre o sistema mucociliar.

Pelos critérios estabelecidos no item 3.1.1 deste estudo, todos os grupos ventilados sofreram algum tipo de lesão pulmonar em decorrência da exposição à ventilação mecânica, sendo esta lesão branda no grupo Baixo Volume e mais intensa nos grupos Alto Volume e Alta Pressão. O impacto da LPIV sobre o aparelho mucociliar é discutido a seguir.

5.1 Função mucociliar

5.1.1 Transportabilidade em traquéia

O transporte mucociliar normal depende de um grande número de fatores inter-relacionados, incluindo-se entre eles um epitélio intacto com funcionamento ciliar coordenado, uma perfeita composição e tamanho da camada periciliar, bem como adequada quantidade de muco com propriedades viscoelásticas ideais (Albertini-Yagi et al., 2005). No nosso estudo, a exposição aos diferentes protocolos de VM não resultou em diferença estatisticamente significativa na velocidade do transporte mucociliar na traquéia dos animais, apesar de uma tendência ao aumento da velocidade ter sido observada no grupo alta pressão (Tabela 5, Gráfico 2). Ao contrário, Trawoger et al. (1997) observando a velocidade de percurso do muco na traquéia de ovelhas verificaram que nesses animais um significativo declínio na velocidade de transporte mucociliar já ocorria após três horas de VM. Outros estudos também já haviam referido uma depressão do transporte mucociliar em pacientes intubados e sujeitos à ventilação mecânica devido a ocorrência de desidratação (Gheber et al., 1998; Nakagawa et al., 2000; Ballard et al., 2002), perda de cílios (Konrad et al., 1995) e até mesmo a influência de infecções pulmonares (Konrad et al., 1994). Convém, no entanto, considerar que a velocidade de transporte mucociliar depende não apenas da velocidade de frequência do batimento ciliar como também do padrão de movimento dos cílios (Teff et al., 2008).

Alguns fatores como a espessura do muco e do fluído periciliar, podem influenciar o transporte mucociliar sem que a reologia do muco seja alterada (Giordano et al., 1978). Adicionalmente, considerando-se que esse transporte é governado pelas forças mecânicas do batimento ciliar e do fluxo aéreo (Schans, 2007), *in vivo*, podemos imaginar que a própria velocidade do fluxo aéreo é um forte fator de influência, especialmente quando são utilizados protocolos com alto fluxo como ocorreu no grupo alta pressão. E não apenas com relação à velocidade, mas também com relação ao direcionamento da secreção, o fluxo aéreo parece ter um papel fundamental. Volpe et al. (2008) observaram que dentro das vias aéreas existe um movimento invariável de entrada e saída de ar e, apesar de necessariamente o volume desse ar nas duas direções ser constante, o pico de fluxo (ou fluxo médio), bem como o tempo de duração desse fluxo, podem ser substancialmente diferentes na inspiração e na expiração, direcionando as secreções ou para dentro ou para fora da árvore brônquica.

5.1.2 Transportabilidade em palato

O epitélio do palato de rã utilizado em nosso estudo tem várias características comuns ao epitélio da via aéreas de mamíferos e tem-se provado ser um modelo útil para estudar o transporte mucociliar em várias condições (Lorenzi et al., 1992; Macchione et al., 1995; Saldiva et al., 1992; Albertini-Yagi et al., 2005). No presente estudo os efeitos agudos da ventilação mecânica sobre a transportabilidade do muco em palato de rã

foram conflitantes (Tabela 6). Entre grupos não foram observadas diferenças após a exposição aos protocolos de VM. Intra-grupo, porém, constatamos que a transportabilidade do muco no palato de rã, apesar de ter diminuído em todos os grupos ventilados, foi apenas estatisticamente significativa no grupo baixo volume ainda que com tendência a significância no grupo alta pressão. Nakagawa et al. (2004) também não observaram alterações significativas na transportabilidade do muco em palato de rã após a utilização de furosemida em cães ventilados mecanicamente. Por outro lado, de Oliveira et al. (2006) verificaram que a transportabilidade *in vitro* não foi alterada agudamente com o uso de pressão positiva constante em vias áreas (CPAP nasal) em indivíduos saudáveis.

Tendo em mente que o estudo da transportabilidade *in vitro* implica no conhecimento das propriedades de transportabilidade do muco, e não no conjunto da interação mucociliar, propriedades do muco e características dos cílios, como o que ocorre no estudo *in vivo* (Nakagawa et al., 2004), inferimos que durante o acoplamento mecânico entre o muco e os cílios do palato pode ter ocorrido certa dissipação de energia e a magnitude desse fenômeno amplificada por um aumento da viscosidade interferiu na eficiência do transporte mucociliar (Girod et al., 1992; Lorenzi et al., 1992). Infelizmente, a quantidade de muco coletada não nos permitiu a análise das condições reológicas do muco antes e após a exposição à ventilação mecânica. Porém não podemos deixar de ponderar que, apesar do modelo de transportabilidade no palato de rã ser um indicador do comportamento global do muco quando transportado por um epitélio normal (King, 1998), a

literatura científica já demonstrou anteriormente que a variabilidade do transporte do muco não deve ser predita somente pela reologia do muco (Lorenzi et al., 1992), ainda que pareça razoável supor que o muco sofre alterações na estrutura do seu complexo glicoproteico quando é submetido às forças geradas pela ventilação mecânica, interferindo assim na sua qualidade e taxa de transportabilidade (Nakagawa et al., 2000; Konrad et al., 1995).

5.1.3 Frequência de batimento ciliar

Entre grupos não foram observadas diferenças após a exposição aos diferentes protocolos de VM. Intra-grupo, considerando o tempo de exposição, ao final dos diferentes protocolos de VM observamos uma diminuição significativa da frequência de batimento ciliar no grupo alta pressão, onde o aparelho mucociliar esteve submetido a uma situação de distensão tecidual constante e também a um fluxo aéreo mais elevado (Tabela 7, Gráfico 4). Já foi observado que o alto pico de fluxo gerado durante a ventilação com pressão controlada (PVC) está associado a um maior dano pulmonar quando comparado ao baixo fluxo obtido na ventilação a volume controlado, com o mesmo volume corrente. O dano foi relacionado ao aumento das forças de tensão e cisalhamento que ocorre durante a inspiração na PVC (Maeda et al., 2004). Outro estudo igualmente observou alterações na frequência de batimento ciliar quando culturas de células foram expostas a diferentes gradientes de pressão transepitelial através da

aplicação de um estresse compressivo cíclico (simulando a respiração normal) ou estático (simulando episódio de bronquioconstrição). Na compressão cíclica houve um aumento do batimento ciliar com alterações significativas nas concentrações de ATP. Na estática os valores não sofreram alteração e os autores concluíram que uma pressão transepitelial não oscilatória não seria motivação para alteração nos níveis de ATP e, conseqüentemente, no batimento ciliar (Button et al., 2007). Ainda no que diz respeito à queda da frequência de batimento ciliar no grupo alta pressão, podemos especular que houve um provável efeito da queda do débito cardíaco neste grupo, com conseqüente hipoperfusão tecidual decorrente da alta pressão intratorácica à qual este grupo foi submetido. Tal fato tem substrato laboratorial na elevação dos níveis de lactato observado neste grupo. Entretanto, este não deve ter sido o único fator de impacto para a queda da frequência de batimento ciliar, visto que o grupo alto volume também apresentou aumento do lactato. Outro fator a interferir no batimento ciliar do grupo alta pressão pode ser o efeito mecânico direto da alta pressão média de via aérea mantida durante todo o ciclo respiratório e todo o tempo de ventilação mecânica. Tal efeito pressórico pode ter levado a uma hipoperfusão direta do epitélio respiratório por ação mecânica neste grupo.

No entanto, apesar da diminuição da frequência de batimento ciliar no grupo alta pressão, neste mesmo grupo observou-se uma tendência ao aumento da transportabilidade do muco na traquéia, mesmo que não estatisticamente significativa. Como já mencionamos, a velocidade de transporte mucociliar depende não apenas da velocidade de frequência do

batimento ciliar como também do padrão de movimento dos cílios, que pode ser otimizado ou não por alguns fatores como características específicas do fluido periciliar (não analisadas em nosso estudo). Especulamos que talvez a VM não tenha afetado a camada periciliar, mantendo-a com a mesma profundidade do comprimento do cílio e facilitando a transportabilidade do muco no grupo alta pressão, apesar da diminuição da frequência de batimento ciliar observada nesse grupo.

5.1.4 Ângulo de contato

O ângulo de contato apresenta uma medida da tensão superficial do muco e se correlaciona com o trabalho de aderência entre o muco e a superfície de contato, isto é, o epitélio (Macchione et al., 1995; Puchelle et al., 1987; Albertini-Yagi et al., 2005). Essa medida tem uma relação proporcionalmente inversa a *wettability* (que representa a habilidade do muco em se espalhar em uma superfície sólida plana). A *wettability* caracterizada por um baixo ângulo de contato representa uma condição adequada a ação de proteção e lubrificação do muco respiratório, favorecendo o *clearance* pulmonar (Girod et al., 1992), contribuindo de modo importante para uma interface adequada entre a superfície do epitélio pulmonar e do muco. Entre grupos não foram constatadas diferenças após a exposição aos diferentes protocolos de VM. Intra-grupo, apesar de termos observado um aumento no ângulo de contato em todos os grupos ventilados (Gráfico 5) após a exposição aos protocolos de ventilação, este aumento

não foi estatisticamente significante. Nesse caso específico ponderamos sobre a aceção estatística em detrimento à significância biológica de nossos achados, uma vez que Girod et al. (1992) concluíram que um ângulo de contato de aproximadamente 20 graus representaria uma condição ótima para um muco ser eficiente e protetor. Nos grupos baixo volume e alta pressão o ângulo mediano final foi de 35 graus e no grupo alto volume 32 graus (Tabela 8). À parte tais considerações, estatisticamente nossos resultados nos levam a crer que as forças de superfície que regem a interação entre o muco e o epitélio não foram prejudicadas com a utilização de diferentes protocolos de ventilação mecânica por um curto período de tempo. Outros estudos que analisaram as propriedades do muco em pacientes submetidos à VM (Nakagawa et al., 2000; Kondo et al., 2002) também não encontraram alteração significativa nas características desse material. Convém pontuar, no entanto, que, apesar dos atributos adesivos das secreções brônquicas bem como a medida do ângulo de contato serem atributos de superfície dependentes dos componentes tenso-ativos presentes no muco (Puchelle et al., 1987; Albertini-Yagi et al., 2005), essas propriedades de superfície do muco são independentes das suas propriedades viscoelásticas.

Mesmo não tendo sido possível em nosso estudo a análise da viscoelasticidade, devemos citar que as avaliações das propriedades reológicas (de deformação e fluxo) das amostras de muco são essenciais na compreensão de suas qualidades funcionais e na determinação dos possíveis fatores responsáveis pelas anormalidades no transporte

mucociliar, especialmente nas doenças pulmonares (King et al., 1979; Lorenzi et al., 1992; Albertini-Yagi et al., 2005).

5.2 Muco ácido e muco neutro

Na traquéia os grupos BV, AV e AP apresentaram uma diminuição significativa da quantidade de muco ácido em relação ao grupo Sham, sugerindo uma possível maior extrusão de muco ácido nos grupos ventilados (Tabela 9, Gráfico 6). De modo geral, também foi observada no epitélio traqueal dos grupos ventilados uma menor quantidade de muco total. Na região de bronquíolos verificamos a diminuição significativa do muco total e muco neutro no grupo baixo volume em comparação com os demais grupos. A maior quantidade de muco total e muco neutro observada nos grupos AV e AP em relação ao grupo ventilado com menor volume sugere, nesta região da árvore brônquica, um aumento da produção de muco na vigência de um provável estímulo mais agressivo. Comparando o grupo AP e AV na região de bronquíolos distais, a menor quantidade de muco total e muco neutro no grupo AP sugerem igualmente uma provável maior extrusão de muco no grupo ventilado no protocolo de alta pressão e talvez um prejuízo na produção de muco por uma hipoperfusão direta do epitélio respiratório por ação mecânica decorrente do aumento da pressão média observada. É conhecido que o epitélio expele o muco em situações específicas (Lippmann et al., 1980; Peatfield e Richardson, 1983). Este mecanismo, denominado exocitose, primeiramente ocorre em resposta a um estímulo extracelular

(Verdugo, 1990) e é provavelmente uma resposta protetora para eliminação de um agente agressor. Alguns estudos, além disso, vêm destacando a questão do estresse oxidativo no epitélio pulmonar decorrente da exposição às forças mecânicas da ventilação artificial (Chess et al., 2005; Chapman et al., 2005, Papaiahgari et al., 2006). Parece-nos coerente supor que a ventilação tenha sido o estímulo para a produção de espécies reativas de oxigênio, desencadeando uma resposta de extrusão irritativa no epitélio traqueal e de bronquíolos.

As células epiteliais das vias aéreas são potencialmente susceptíveis aos danos originados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) devido à localização específica desse epitélio que o expõe tanto a agentes oxidantes endógenos quanto exógenos (Papaiahgari et al., 2007). Estas células se utilizam de vários mecanismos antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos como vitaminas e componentes de baixo peso molecular, ou enzimas específicas, para suas defesas. Entre outros materiais que também estão associados à proteção do epitélio das vias aéreas contra agentes oxidantes, destaca-se o muco respiratório que contém glicoproteínas que reagem com o H_2O_2 , degradando-o (Wright et al., 1994). Quando o delicado balanço entre as agressões oxidativas e as defesas antioxidantes está prejudicado, verificam-se prejuízos diversos. Especificamente quanto ao muco respiratório, a resposta ao estresse oxidativo vem sendo relacionada ao aumento da produção e secreção de muco e também ao prejuízo no *clearance* pulmonar (Wright et al., 1994). Isso foi demonstrado por Even-Tzur et al. (2008) quando estudaram o efeito do estresse mecânico causado

pelo fluxo de ar, laminar e turbulento (12 e 48 L/min), em cultura de células do epitélio nasal de humanos por 5, 15 e 30 min., e verificaram que houve um aumento importante na secreção de muco, sendo este aumento mais associado ao tempo de exposição do que ao nível de agressão do agente, neste caso, o fluxo. Outras pesquisas com diferentes modos ventilatórios também tem descrito alterações histopatológicas traqueobronquiais representadas pela perda de goblet cells no epitélio mucociliar (Boat et al., 1973; Wiswell e Wiswell, 1990). Em nosso estudo as Figuras 17 e 18 são bem ilustrativas em relação a presença de muco ácido e neutro nos diferentes epitélios.

5.3 Morfologia celular do aparelho mucociliar

A análise amostral de microscopia eletrônica realizada neste trabalho trouxe informações principalmente indicativas de sofrimento celular.

Verificou-se nos grupos AV e AP um aumento no número de vesículas citoplasmáticas e indícios de edema celular. No grupo AP foi observada uma aparente diminuição de microvilos e difícil visualização das mitocôndrias, além de aspectos sugestivos de afrouxamento do complexo juncional e áreas de perda ciliar.

Células normais apresentam-se em um estado de equilíbrio homeostático capaz de lidar com as demandas fisiológicas. Entretanto, estresses fisiológicos podem desencadear processos de adaptação celular para preservação de sua integridade morfofuncional. Quando excedidos os

limites da capacidade de adaptação, segue-se a lesão celular que, até certo ponto, pode ser reversível. Se o estímulo lesivo persistir ou for suficientemente intenso desde o início a célula sofrerá lesão irreversível e morte (Cotran et al., 1991).

Apesar de existirem vários estímulos potencialmente lesivos à célula, destacam-se dois deles que podem se relacionar às observações deste estudo: hipóxia e agentes físicos. Com relação à hipóxia, não apenas a falta de oxigênio, mas o oxigênio ativado parcialmente reduzido constitui um importante mediador de morte celular uma vez que os radicais livres causam peroxidação lipídica e outros efeitos deletérios para a estrutura da célula. A manifestação precoce e mais comum da lesão isquêmica é a tumefação celular aguda. Do ponto de vista ultra-estrutural, durante o processo de tumefação celular, as células perdem as microvilosidades e ocorre a deterioração e afrouxamento das conexões intercelulares. Até certo ponto estes distúrbios são reversíveis, porém persistindo a isquemia segue-se a lesão irreversível acompanhada de vacuolização das mitocôndrias, lesão de membranas, edema dos lisossomas e entrada de cálcio nas células. Além disso, a queda do pH (também observada no grupo AP, porém sem significância estatística), juntamente com as alterações de composição iônica da célula, levam à lesão das membranas lisossômicas, seguida de extravasamento de enzimas dentro do citoplasma e digestão dos componentes celulares.

Quanto à lesão celular induzida por agente físico, destaca-se que na região da traquéia ocorre o maior impacto das forças de cisalhamento

geradas pelo fluxo durante a ventilação mecânica (vide Figura 1). Conforme abordado no Item 1.1 da Introdução, várias pesquisas têm demonstrado que as forças de tensão e cisalhamento geradas pela VM podem levar ao estresse mecânico com consequências patológicas nos pulmões através de processos de mecanotransdução. Uma vez que as alterações morfológicas da lesão celular tornam-se aparentes somente após ter sido danificado algum sistema bioquímico crítico dentro da célula (Cotran et al., 1991), os achados de microscopia eletrônica nos levam a supor que a ventilação mecânica com Alto Volume e Alta Pressão pode desencadear respostas adaptativas das células do sistema mucociliar através de mecanismos de mecanotransdução, no sentido de manter a homeostasia. No grupo AP no qual, além do estímulo mecânico de tensão pelo aumento da $P_{média}$, houve também um maior impacto das forças de cisalhamento pelo alto fluxo, os mecanismos adaptativos parecem não ser suficientes, evoluindo assim para uma provável lesão celular irreversível.

As alterações hemodinâmicas discutidas no item 5.4 corroboram as características do epitélio de revestimento traqueal observadas na microscopia eletrônica relativas ao sofrimento celular inicial no grupo Alto Volume e mais acentuado ainda no grupo Alta Pressão. Particularmente no grupo AP, essas verificações apóiam ainda os achados de redução na frequência de batimento ciliar e maior sofrimento do epitélio neste grupo.

5.4 Ventilação mecânica e pulmão

No nosso estudo, apesar de todos os grupos terem mantido uma boa relação de oxigenação (FiO_2/PaO_2), algumas reflexões são necessárias sobre o impacto da ventilação mecânica nos grupos ventilados. No grupo alto volume (AV) observamos a diminuição do bicarbonato e aumento do lactato, mas sem alterações significativas na potência de hidrogênio (pH). No grupo alta pressão (de um modo geral, o que mais sofreu em relação ao modo ventilatório aplicado) observamos um quadro de iminente acidose após o protocolo de ventilação mecânica, com diminuição do bicarbonato e um aumento considerável do lactato sugerindo um distúrbio misto (respiratório e metabólico). Neste mesmo grupo observamos também uma diminuição significativa da diurese, sendo este grupo o que apresentou pior relação entre oferta de fluidos e diurese (Tabela 1). Sabe-se, no entanto, que nos pacientes em ventilação mecânica à pressão positiva contínua, ocorre freqüentemente diminuição da diurese, retenção hídrica e edema. A pressão positiva no final da expiração (PEEP) pode influenciar o metabolismo hídrico através de vários mecanismos, tais como a diminuição do retorno venoso ao tórax, aumento da pressão venosa central e da pressão venosa ao nível capilar, e alterações perfusionais renais. O PEEP foi menor nos grupos BV e AV. O PEEP maior no grupo AP fez com que a pressão média neste grupo fosse maior em relação aos demais, justificando as alterações hemodinâmicas observadas.

Neste mesmo grupo houve também uma diminuição significativa da complacência dinâmica e aumento da resistência respiratória (Tabela 3). O achado macroscópico também é mais expressivo nos grupos alto volume e alta pressão, onde observamos lesões hemorrágicas, áreas localizadas de atelectasias e áreas de consolidação hemorrágica (Figura 15). De modo interessante, os achados de microscopia demonstrando um aumento do infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar em todos os grupos ventilados (Gráfico 1) corroboram os estudos de Conrad et al. (2005), Uhlig (2002) e Wolthuis et al. (2009), que já verificaram anteriormente que até mesmo uma estratégia de ventilação mecânica que não acarretasse em destruição tecidual, poderia estimular a liberação de uma cascata de mediadores inflamatórios através de mecanismos de mecanotransdução. Esses autores sugerem que uma estratégia de ventilação efetivamente não lesiva ainda estaria distante da realidade atual.

Particularmente, sobre a questão do infiltrado inflamatório, é essencial considerar que, apesar dos neutrófilos serem abundantes no sangue, estão praticamente ausentes nos tecidos pulmonares em pessoas saudáveis. Em uma reação inflamatória produzem-se vários fatores quimiotáticos para os neutrófilos, que rapidamente migram para o sítio de inflamação, onde exercem função fagocítica contra bactérias, fungos e vírus. Estes neutrófilos liberam substâncias que são tóxicas aos microorganismos, mas também lesivas aos tecidos, como metabólitos do oxigênio, proteases, fosfolipases e óxido nítrico (Rufino, Lapa e Silva, 2006). Um desses fatores é a elastase neutrofílica, uma proteinase liberada dos grânulos primários de

leucócitos polimorfonucleares. A elastase neutrofílica pode solubilizar matriz extracelular e é importante na patogênese do enfisema pulmonar, doença respiratória aguda, glomerulonefrite, artrite reumatóide e outras doenças inflamatórias. Sua participação na inibição da atividade ciliar e na produção de espécies reativas de oxigênio também é conhecida na literatura científica (Scuri et al., 2007).

Considerando todas as observações acima, focamos a avaliação da função mucociliar pela comparação pré e pós-exposição à ventilação mecânica, especificamente em cada grupo ventilado, uma vez que modos ventilatórios diferentes apresentam variáveis próprias e com impactos distintos ao organismo.

Adicionalmente, constatamos que o estudo do aparelho mucociliar dentro de um cenário que envolve a ventilação mecânica apresenta várias dificuldades, o que, em parte, esclarece porque a literatura científica oferece pouca informação consolidada sobre este tema. Modelos *in vitro* ou mecânicos geralmente são adotados para investigações sobre este assunto. Recentemente Volpe et al. (2008) apresentaram um interessante trabalho com pulmão mecânico e muco artificial, demonstrando que determinados parâmetros de VM podem facilitar a mobilização das secreções no pulmão. Todavia, os modelos *in vivo* possibilitam uma correlação mais próxima com as condições da vida real, ainda que o desmembramento de cada um dos mecanismos de lesão bem como o estudo de sua ação isolada seja difícil. Nesses modelos existe mais fidedignidade na composição e consistência do muco (fase sol e fase gel), nas propriedades de adesão, complacência e

elastância, e também na própria conformação da árvore brônquica onde os diferentes diâmetros geram também diferentes gradientes de velocidade, pressão e resistência. Todos esses fatores, bem como outros inerentes ao modelo *in vivo*, contribuem de modo importante para o movimento das secreções pulmonares.

Outras considerações importantes com relação a componentes específicos da ventilação mecânica e sua potencial influência na função mucociliar também devem ser ponderadas. Esses componentes envolvem a anestesia, toxicidade do oxigênio, intubação traqueal, temperatura corporal e sistema de condicionamento de gases.

Anestesia

Existem controvérsias na literatura em relação à influência da anestesia na função mucociliar. Rubin et al. (1990a) investigaram amostras de muco de 25 pacientes intubados, sem doença pulmonar prévia, para avaliação das propriedades reológicas desse material, bem como da transportabilidade pelo método palato de rã. Comparando com amostras de indivíduos não ventilados concluíram que não havia uma diferença significativa da reologia nestes dois grupos e que a alteração da transportabilidade encontrada nos pacientes ventilados deve ter ocorrido por razões outras que não a anestesia utilizada. Konrad et al. (1992) mensuraram a frequência de batimento ciliar em pacientes ventilados e anestesiados com midazolam, fentanil e pancurônio, comparando-os com

dados broncoscópicos obtidos antes da intubação. A avaliação foi realizada pela análise da progressão do radiofármaco Tecnécio-99m e a conclusão do estudo foi que o procedimento anestésico utilizado não afetou a frequência de batimento ciliar no grupo ventilado mecanicamente. Por outro lado, Ledowski et al. (2006), estudando pacientes de cirurgias eletivas, sem doença pulmonar prévia, e comparando-os em dois grupos de diferentes protocolos anestésicos, observaram que o tipo de anestésico utilizado pode contribuir para a depressão da velocidade de transporte do muco em brônquios. Naquele estudo o sevoflurane associado ao remifentanil teve uma ação depressiva maior quando comparado com o propofol associado ao remifentanil. A parte de tais considerações, se a anestesia poderia inferir ou não nas variáveis analisadas em nosso estudo, acreditamos que tal *viés* foi minimizado pelo fato de que todos os animais receberam idêntico protocolo de anestesia.

Toxicidade do oxigênio

É consenso que o uso prolongado e excessivo do oxigênio aumenta o risco de produzir lesões no pulmão produzindo a chamada síndrome por hiperóxia onde são observadas alterações dos sinais vitais como depressão do estímulo ventilatório, supressão da eritropoiese evento de vasodilatação pulmonar e vasoconstrição sistêmica. Outras alterações como atelectasias de absorção e hipercapnia hiperóxica também estão relacionados ao aumento da fração inspirada de oxigênio (FiO_2) (Brewis, 1969; Cardoso e

Ribeiro, 2000). Apesar dos limites de toxicidade do oxigênio serem apenas aproximados, na prática acredita-se que uma FiO_2 acima de 50% seja potencialmente danosa ao organismo (Cardoso e Ribeiro, 2000). Entretanto, quando Boat et al. (1973) estudaram os efeitos do oxigênio em culturas de células de traquéias extraídas de neonatos recém falecidos verificaram que, especificamente em relação ao aparelho mucociliar, as alterações relativas à diminuição do batimento ciliar, perda de células ciliadas na superfície epitelial, hipersecreção inicial de muco seguida de hipossecreção, ocorreram apenas após 24 horas de exposição das culturas a concentrações de oxigênio de 80%. Em nosso estudo não foram utilizadas frações inspiradas de oxigênio acima de 50% (Tabela 2), o que nos leva a supor que este não tenha sido um fator de impacto nos resultados observados.

Intubação traqueal

Sabe-se que o processo de intubação pode alterar a secreção de muco por efeito irritativo, ativando receptores locais. Além disso, a exclusão das vias aéreas superiores pela cânula traqueal diminui consideravelmente o condicionamento do ar inspirado, já que a ventilação gerada pelos ventiladores mecânicos não possui sistema eficiente de umidificação (Albertini-Yagi et al., 2005). Muitas vezes fatores mecânicos relacionados ao material utilizado também podem ser potencialmente danosos para o epitélio traqueal. Um estudo interessante pesquisou a influência do balonete (*cuff*) da cânula utilizada na ventilação mecânica em cães. Este estudo

demonstrou que naqueles animais onde o balonete foi insuflado houve uma diminuição significativa da transportabilidade no epitélio traqueal. Em contrapartida, os animais que utilizaram cânula sem balonete não apresentaram diminuição da transportabilidade. O mais interessante é que as medidas foram obtidas da traquéia distal em ambos os grupos e não na região adjacente ao balonete (Sackner et al., 1975). Como demonstrado na Figura 12, procuramos evitar a lesão endotraqueal coletando amostras de muco imediatamente após o término da cânula e amostras de tecido traqueal na região próxima à Carina (sem contato com a cânula e sem previa manipulação quando realizada a coleta de muco). Além disso, tivemos o cuidado de utilizar cânula sem balonete nos animais ventilados.

Temperatura corporal

Consideramos que o fato de não termos utilizado nenhum sistema de aquecimento para manutenção da temperatura corporal dos animais não teve efeito significativo em nossos resultados. Apesar de não existir referência deste assunto especificamente em relação ao aparelho mucociliar e ventilação mecânica, Suzuki et al. (2004) estudando os efeitos da hipertermia (41 °C) e hipotermia (33 °C) em coelhos submetidos a protocolos para estudar o estresse térmico na lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica constataram que a normotermia e a hipotermia, ao contrário da hipertermia, não aumentam os efeitos lesivos da ventilação mecânica sobre o pulmão.

Sistema de condicionamento de gases

Apesar da recomendação de que um ótimo condicionamento dos gases inspirados pode ser obtido com o aquecimento ao nível da temperatura corporal em um ambiente de 100% de umidade (Williams et al., 1996), já foi observado anteriormente que nestas condições pode ocorrer muita retenção de líquido nas vias aéreas, com a alteração na qualidade do muco, apresentando-se mais liquefeito e com maior quantidade de bolhas de ar (Eckerbom et al., 1991). Assim ao delimitar a temperatura de aquecimento dos gases em 33 °C tentamos evitar duas situações específicas que poderiam influenciar nas propriedades do muco respiratório: a inalação de gases secos ou a inalação de gases excessivamente umidificados (Nakagawa et al., 2000; Nakagawa et al., 2004; Eckerbom et al., 1991).

5.5 Limitações

Este estudo foi elaborado inicialmente para estabelecer conceitos e princípios sobre os efeitos da ventilação mecânica sobre o aparelho mucociliar. Não obstante, algumas limitações metodológicas bem como a relevância clínica dos achados devem ser passíveis de questionamentos em alguns aspectos.

Primeiramente, a coleta de muco foi insuficiente em alguns animais pelo desenvolvimento de edema pulmonar, sangramento ou simplesmente porque não havia material suficiente próximo a região da Carina. Como já havia sido relatada na literatura (Sleigh et al., 1988), esta é uma dificuldade

freqüente no estudo mucociliar, que limita a análise de alguns parâmetros específicos. No nosso caso inviabilizou a análise da reologia do muco. Esta é uma observação importante desde que o aumento da viscoelasticidade do muco respiratório vem sendo associado à formação de colônias de bactérias (Matsui et al., 2006). Adicionalmente, outros estudos têm demonstrado que alterações das propriedades biofísicas do muco podem ser secundárias a infecções (McShane et al., 2004; Bush et al., 2006). Apesar dessas observações está claro na literatura científica que um grande fator que determina a reologia do muco é a sua hidratação (Sleigh et al., 1988; King, 2006; Verdugo, 1990), o que foi bem considerado no escopo do nosso estudo.

Outra consideração diz respeito à característica inerente ao muco, que é um fluido não Newtoniano. Conforme o muco sofre algum tipo de atrito, as diferenças na forma e tamanho de suas moléculas fazem com que apresente uma resposta pouco constante e susceptível a influências externas (como durante a aplicação de um determinado fluxo de ar ou durante a própria manipulação do material). Embora o armazenamento, bem como as técnicas de manipulação do muco, foi seguido para minimizar os possíveis efeitos de alteração da coesão do muco, não é possível ignorar a presença dos fatos mencionados acima.

Outros fatores relatados como agentes que podem influenciar o equilíbrio da função mucociliar são a ação de medicamentos específicos (Kondo, 2002) e o posicionamento dos pacientes ventilados mecanicamente (Bassi, 2007), que não foram objeto da presente pesquisa.

Apesar destas limitações, o nosso modelo permitiu a visualização da resposta do aparelho mucociliar quando exposto a diferentes modos ventilatórios.

De modo interessante, observamos que até mesmo uma estratégia que utiliza baixo volume corrente apresenta relativo impacto sobre o pulmão, sendo o aumento do infiltrado inflamatório pulmonar verificado em todos os grupos ventilados pelo período de três horas e meia.

Os diferentes protocolos de ventilação mecânica não produziram alteração na transportabilidade na traquéia dos animais estudados e tampouco no ângulo de contato das amostras de muco coletadas. A frequência de batimento ciliar diminuiu no grupo alta pressão e respostas fisiológicas decorrentes dessa alta pressão podem explicar parcialmente o evento.

As respostas observadas em relação ao muco ácido, muco neutro e muco total em traquéia e bronquíolos sugerem um aumento na produção e extrusão de muco nos grupos ventilados com alto volume e alta pressão, talvez devido ao estímulo das forças físicas geradas pela ventilação mecânica. Sabe-se que o muco ácido é mais rico em pontes sulfatadas, mais viscoso e de mais difícil transporte pelo aparelho mucociliar. Sendo o principal formador da fase gel, sua presença aumentada pode acarretar em impactação mucóide e em déficits de transporte, facilitando a colonização bacteriana e a instalação de infecções no pulmão.

O estudo do movimento das secreções pulmonares na situação de ventilação mecânica é difícil, o que em parte explica porque existem tão

poucas informações sobre este assunto na literatura científica. Entendemos, no entanto, que tal estudo se faz extremamente necessário para que sejam consideradas as questões relativas ao *clearance* pulmonar no momento de ajuste do ventilador.

6 CONCLUSÃO

As forças geradas pela ventilação mecânica têm impacto direto sobre o aparelho mucociliar, alterando suas propriedades funcionais e sua morfologia. Aparentemente a VM acarreta desequilíbrio na produção de muco, sendo essa alteração mais visível quando utilizado um alto volume corrente e uma maior pressão média pulmonar (associada a um fluxo de ar aumentado). O aumento da pressão média com alto fluxo dos gases ventilados também ocasiona maior sofrimento celular do aparelho mucociliar, disfunção da frequência de batimento ciliar e provável perda ciliar. Tais alterações se devem provavelmente ao efeito das forças físicas geradas pela VM associadas a prováveis oscilações na resposta inflamatória e no fluxo sanguíneo local.

7 ANEXOS

Anexo A – Protocolo de anestesia

Tela do programa Excel® exemplificando a planilha utilizada para cálculo do protocolo de anestesia de acordo com o peso de cada animal. Trata-se de protocolo padrão desenvolvido anteriormente pela equipe do LIM 09 - Departamento de Córdio-Pneumologia.

PROTOCOLO LPIV Coelhos							24/01/2007
	Dose mg/kg	peso	frasco mg	total ml/h	ml/amp	horas	
MPA							
Acepran	0,1	3,40	10	0,68	20,0		
Cetamina	3	3,40	50,00	2,04	10,0		
Midazolam	0,4	3,40	5,00	0,272	3,0		
Indução							
Propofol	2	3,40	10,00	0,68			
Manutenção							
Midazolam	0,2	3,40	5,00	0,136	3,0	10	1,36
Cetamina	1	3,40	50,00	0,068	10,0	10	0,68
Acepran	0,08	3,40	10	0,0272	20,0	10	0,272
Pancurônio	0,15	3,40	2,00	0,255	2,0	10	2,55
							4,862
SF							60
SOMA							64,862
					VAZÃO/ML/H		6,4862
NOR	0,2	3,4	1	0,68	4	10	6,8
SF							200
					TOTAL		206,8
					VAZÃO/ML/H		20,68

Anexo B – Transportabilidade in situ

Valores individuais dos resultados obtidos na análise de transporte *in situ* na traquéia de coelhos. Velocidade em milímetros por segundo observadas pela excursão de carbono coloidal em fragmento de traquéia coletados no início e ao final dos protocolos de ventilação mecânica.

Grupo	Vel mm/s inicial	Vel mm/s final
BV	.	0,008658
BV	0,004000	.
BV	0,006098	0,006472
BV	0,005882	0,009009
BV	0,004425	0,008065
BV	0,007937	0,006270
AV	.	0,008333
AV	0,004854	0,003953
AV	0,005634	0,009050
AV	0,005882	0,004926
AV	0,005797	0,008734
AV	0,004464	0,009259
AV	0,005587	0,007937
AP	.	.
AP	.	.
AP	0,008584	0,005882
AP	0,006192	0,008811
AP	0,006116	0,015385
AP	0,008547	0,017094
AP	0,005780	0,013605
AP	0,008969	0,014184

Anexo C – Transportabilidade in vitro

Valores individuais dos resultados obtidos na análise de transporte *in vitro* em palato de rã (BV: baixo volume, AV: alto volume e AP: alta pressão). Velocidade relativa (muco coelho/muco rã) comparando amostras de muco coletadas no início e ao final dos protocolos de ventilação mecânica.

Grupo	Valor Relativo Inicial	Valor Relativo Final
BV	.	.
BV	.	.
BV	.	.
BV	.	.
BV	.	.
BV	.	1,171
BV	.	0,950
BV	.	0,900
BV	.	0,930
BV	.	1,130
BV	1,071	0,929
BV	1,412	0,941
BV	1,250	0,958
BV	1,333	0,933
BV	1,094	0,981
BV	0,786	1,071
BV	0,611	0,778
BV	0,970	0,970
BV	0,828	1,448
BV	0,788	0,848
BV	1,509	1,132
BV	2,195	2,000
BV	2,356	1,378
BV	1,444	1,407
BV	1,857	1,619
BV	2,286	0,952
BV	2,273	1,000
BV	1,840	0,800
BV	2,696	0,957
BV	1,667	0,917
AV	.	.
AV	.	.
AV	.	.
AV	.	.

(Continua)

(Continua)

(Conclusão)

Grupo	Valor Relativo Inicial	Valor relativo Final
AP	.	0,895
AP	.	0,857
AP	.	0,600
AP	.	1,097
AP	.	1,071
AP	.	1,000
AP	.	1,161
AP	.	0,600
AP	.	1,043
AP	.	0,714
AP	1,226	0,903
AP	1,576	0,788
AP	1,667	0,889
AP	1,045	0,818
AP	0,857	1,048
AP	1,103	.
AP	1,152	.
AP	1,667	.
AP	1,517	.
AP	1,071	.
AP	1,231	1,308
AP	0,966	1,034
AP	0,621	1,379
AP	0,818	1,727
AP	0,957	2,000
AP	1,407	1,185
AP	1,407	1,259
AP	1,241	1,241
AP	1,692	1,077
AP	1,071	1,143

Anexo D – Batimento ciliar

Valores individuais dos resultados obtidos na análise da frequência de batimento ciliar (BV: baixo volume, AV: alto volume e AP: alta pressão). Frequência expressa em Hertz, observada em fragmento de traquéia coletados no início e ao final dos protocolos de ventilação mecânica.

Grupo	Velocidade inicial	Velocidade Final
BV	.	14,9200
BV	.	14,9200
BV	.	12,5000
BV	11,2360	.
BV	11,6279	.
BV	12,5000	.
BV	11,2360	10,2041
BV	10,6383	9,9010
BV	10,9090	10,9890
BV	12,8205	.
BV	12,0482	.
BV	12,8205	.
BV	13,6986	14,0845
BV	14,9254	14,9254
BV	13,5135	14,9254
BV	13,3333	16,3934
BV	14,0845	17,5439
BV	14,9254	16,9492
AV	.	10,3000
AV	.	13,3333
AV	.	11,9000
AV	12,0482	10,4167
AV	13,3333	10,0000
AV	14,4928	11,9048
AV	.	11,7647
AV	.	12,3457
AV	.	11,9048
AV	12,1951	13,5135
AV	11,6279	12,9870
AV	12,3457	13,8889
AV	12,0482	14,9254
AV	12,3457	15,6250
AV	12,9870	15,3846
AV	11,9048	13,8889

(Continua)

(Conclusão)		
Grupo	Velocidade inicial	Velocidade Final
AV	12,5000	15,6250
AV	12,3457	15,3846
AV	12,3457	14,7059
AV	12,8205	14,2857
AV	12,9870	13,5135
AP	.	14,4900
AP	.	14,0800
AP	.	13,8800
AP	.	.
AP	.	.
AP	.	.
AP	11,6279	9,9010
AP	13,3333	9,1743
AP	13,8889	8,0645
AP	11,1111	9,1743
AP	11,4943	10,7527
AP	10,9890	10,2041
AP	.	.
AP	.	.
AP	.	.
AP	15,8730	10,8696
AP	14,4928	12,0482
AP	14,7059	10,9890
AP	12,6582	11,6279
AP	13,3333	11,7647
AP	13,5135	12,0482
AP	14,0845	17,2414
AP	14,2857	16,3934
AP	15,1515	16,6667

Anexo E – Ângulo de contato

Valores individuais dos resultados obtidos na análise da medida do ângulo de contato (BV: baixo volume, AV: alto volume e AP: alta pressão). Valores em graus observados em amostras de muco coletadas no início e ao final dos protocolos de ventilação mecânica.

Grupo	Inicial	Final
BV	.	.
BV	.	39
BV	28	35
BV	28	35
BV	24	31
BV	31	26
AV	.	.
AV	21	32
AV	19	32
AV	25	39
AV	44	30
AV	24	23
AV	26	32
AP	.	.
AP	.	.
AP	.	35
AP	.	35
AP	28	37
AP	35	.
AP	30	26
AP	20	26

Anexo F – Medida de peso e dados de ventilação

Dados individuais do peso e dos valores mensurados no início e ao final dos diferentes protocolos de ventilação mecânica (BV: baixo volume, AV: alto volume e AP: alta pressão). Peso em gramas, Vt: volume corrente em mililitros, Ppeak: Pressão de pico em cmH₂O.

Grupo	Animal	Peso	Vt Inicial	Vt Final	Ppeak Inicial	Ppeak Final
BV	2	3640	23,40	23,60	17,30	17,76
BV	3	3260	28,80	23,52	15,73	15,69
BV	4	3380	24,04	22,26	14,71	17,45
BV	5	3180	32,38	33,53	17,06	18,73
BV	6	3580	35,77	34,87	20,19	18,50
BV	7	3200	24,81	29,58	13,28	16,18
AV	1	3280	23,84	40,12	17,91	27,46
AV	3	3500	37,39	59,89	19,07	28,54
AV	4	3600	33,19	59,89	18,47	25,81
AV	5	3400	35,09	51,13	18,63	23,26
AV	6	3200	38,03	49,48	20,48	24,00
AV	7	3370	42,27	61,23	21,28	26,97
AV	8	3230	36,03	62,52	18,15	33,06
AP	1	2940	17,14	21,22	16,16	30,98
AP	2	3460		20,35		31,60
AP	3	3800	30,31	24,61	13,47	28,01
AP	4	3160	27,04	27,35	15,70	30,60
AP	5	4040	37,88	35,37	18,63	28,22
AP	6	3400	34,77	28,95	18,38	29,79
AP	7	3200	32,64	34,53	18,91	30,41
AP	8	3410	31,92	29,94	13,65	30,73
Sham	1	2720				
Sham	2	2920				
Sham	3	2930				
Sham	4	2490				
Sham	5	2790				
Sham	6	2740				

Anexo G1 – Dados de ventilação

Dados individuais dos valores mensurados no início e ao final dos diferentes protocolos de ventilação mecânica (BV: baixo volume, AV: alto volume e AP: alta pressão). Pmean: Pressão média, Pplat: Pressão de Platô, e Peep: pressão expiratória final positiva em cmH₂O.

Grupo	Animal	Pmean Inicial	Pmean Final	Pplat Inicial	Pplat Final	Peep Inicial	Peep Final
BV	2	8,91	8,98	17,30	17,45	5,26	5,30
BV	3	8,28	8,20	15,43	15,29	5,26	5,31
BV	4	7,57	7,90	14,28	16,85	5,32	5,31
BV	5	8,61	9,03	16,54	18,02	5,28	5,38
BV	6	9,51	9,18	19,85	18,10	5,38	5,34
BV	7	8,77	9,05	13,18	15,95	5,22	5,30
AV	1	13,29	10,95	17,07	26,63	5,69	5,37
AV	3	9,17	12,45	18,45	27,95	5,25	5,36
AV	4	8,87	10,96	17,85	25,11	5,36	5,38
AV	5	9,18	9,77	18,11	22,33	5,34	5,29
AV	6	9,22	11,52	19,84	23,58	5,30	5,30
AV	7	9,60	11,8	20,47	26,15	5,29	5,23
AV	8	8,63	13,91	17,44	32,50	5,36	5,43
AP	1	7,87	23,21	15,91	30,30	5,27	14,42
AP	2		22,49		30,67		15,48
AP	3	7,42	19,63	12,97	27,24	5,31	12,42
AP	4	8,28	21,12	15,34	30,35	5,30	12,36
AP	5	10,22	16,76	18,40	27,55	5,37	10,34
AP	6	9,16	18,55	17,97	29,28	5,30	8,35
AP	7	9,95	15,37	18,48	29,34	5,39	8,31
AP	8	8,66	19,36	13,38	30,34	5,27	13,34

Anexo G2 – Dados de ventilação

Dados individuais dos valores mensurados no início e ao final dos diferentes protocolos de ventilação mecânica (BV: baixo volume, AV: alto volume e AP: alta pressão). Flow: Fluxo em litros por minuto, Rti: Resistência tecidual em cmH₂O/L/seg, Cdyn: Complacência dinâmica em ml/cmH₂O.

Grupo	Animal	Flow Inicial	Flow Final	Rti Inicial	Rti Final	Cdyn Inicial	Cdyn Final
BV	2	2,20	2,30	64,40	56,08	2,40	2,19
BV	3	3,05	2,20	42,22	48,69	3,19	2,67
BV	4	2,86	2,85	40,22	46,17	2,86	2,12
BV	5	2,96	3,15	43,06	64,91	3,15	3,36
BV	6	3,40	2,85	41,01	61,59	2,92	3,40
BV	7	1,63	2,60	40,58	81,69	3,27	3,55
AV	1	2,83	3,70	54,99	51,53	1,78	2,05
AV	3	3,12	5,48	42,51	56,14	3,20	3,03
AV	4	3,26	4,62	38,17	44,51	3,07	3,74
AV	5	3,05	4,49	37,62	46,52	3,10	3,67
AV	6	3,76	3,77	44,94	46,85	3,11	3,12
AV	7	3,98	5,42	54,78	56,37	3,47	3,68
AV	8	3,79	5,84	43,49	65,08	3,56	2,77
AP	1	2,55	7,25	75,49	47,62	2,04	1,29
AP	2		8,59		36,46		1,18
AP	3	2,46	8,56	41,42	44,50	4,59	1,58
AP	4	2,74	9,36	39,35	53,82	2,93	1,47
AP	5	7,92	9,99	69,12	74,40	3,45	2,18
AP	6	3,09	7,00	58,98	116,8	3,29	1,45
AP	7	9,44	9,95	51,47	73,16	2,69	1,70
AP	8	7,60	8,07	34,45	69,37	4,20	1,85
Sham	1			38,70		4,80	
Sham	2			53,16		3,83	
Sham	3			53,72		3,70	
Sham	4			32,16		4,57	
Sham	5			36,51		4,78	
Sham	6			38,12		3,75	

8 REFERÊNCIAS

Albertini-Yagi CS, Oliveira RC, Vieira JE, Negri EM, de Oliveira LR, Saldiva PH, Lorenzi-Filho G. Sputum induction as a research tool for the study of human respiratory mucus. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005;145(1):101-10.

Atabai K, Ishigaki M, Geiser T, Ueki I, Matthay MA, and Ware LB. Keratinocyte growth factor can enhance alveolar epithelial repair by nonmitogenic mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283(1):L163-9.

Ballard ST, Trout L, Mehta A, Inglis SK. Liquid secretion inhibitors reduce mucociliary transport in glandular airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283(2):L329-35.

Barbas CSV, Amato MBP, Rodrigues Jr M. Técnicas de assistência ventilatória. In: Knobel E, editor. *Condutas do paciente grave*. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2002. Cap.20, p.321-52.

Barroso FC, Lorenzi-Filho G, Carvalho CR, Pimentel M, Boueri FV, Barbas filho JV. Transporte de eletrólitos no epitélio respiratório dos portadores de fibrose cística. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*. 1992;47(2):76-8.

Bassi GL, Zanella A, Cressoni M, Stylianou M, Kolobow T. Following tracheal intubation, mucus flow is reversed in the semirecumbent position: possible role in the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med*. 2008;36(2):518-25.

Bersten AD, Bryan DL. Ventilator-induced lung injury: do dynamic factors also play a role? *Crit Care Med*. 2005;33(4):907-9.

Boat TF, Kleinerman JI, Fanaroff AA, Matthews LW. Toxic effects of oxygen on cultured human neonatal respiratory epithelium. *Pediatr Res*. 1973;7(7):607-15.

Boucher RC. Human airway ion transport – part one. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994a;150(1):271-81.

Boucher RC. Human airway ion transport – part two. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994b;150(2):581-93.

Braga PC. Methods for investigation of mucus: multidisciplinary approach. In: Allegra L, Braga PC, editors. *Bronchial mucology and related diseases*. New York: Raven Press; 1990. p.13-26.

Brewis RA. Oxygen toxicity during artificial ventilation. *Thorax*. 1969;24(6):656-66.

Broccard AF, Hotchkiss JR, Suzuki S, Olson D, Marini JJ. Effects of mean airway pressure and tidal excursion on lung injury induced by mechanical ventilation in an isolated perfused rabbit lung model. *Crit Care Med*. 1999;27(8):1533-41.

Bush A, Payne D, Pike S, Jenkins G, Henke MO, Rubin BK. Mucus properties in children with primary ciliary dyskinesia: comparison with cystic fibrosis. *Chest*. 2006;129(1):118-23.

Button B, Picher M, Boucher R. Differential effects of cyclic and constant stress on ATP release and mucociliary transport by human airway epithelia. *J Physiol*. 2007;580(Pt 2):577-92.

Camargo Pires-Neto R, Lichtenfels AJ, Soaes SR, Macchione M, Saldiva PH, Dolhnikoff M: Effects of Sao Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environl Res.* 2006;101(3):356-61.

Cardoso PR, Ribeiro SP. Toxicidade do oxigênio. In: Carvalho CR, editor. *Ventilação mecânica*. São Paulo: Atheneu; 2000. v.2, p.283-90. Avançado (Série Clínicas Brasileiras de Medicina Intensiva).

Carney D, DiRocco J, Nieman G. Dynamic alveolar mechanics and ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med.* 2005;33(3 Suppl):S122-8.

Caruso P. *Resposta inflamatória e fibrótica em pulmões normais submetidos à ventilação mecânica: variação antero-posterior da lesão pulmonar induzida pelo ventilador* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2000.

Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, Hassid A, Desai LP, Waters CM. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289(5):L834-41.

Chess PR, O'Reilly MA, Sachs F, Finkelstein JN. Reactive oxidant and p42/44 MAP kinase signaling is necessary for mechanical strain induced proliferation in pulmonary epithelial cells. *J Appl Physiol.* 2005;99(3):1226-32.

Chu EK, Foley JS, Cheng J, Patel AS, Drazen JM, Tschumperlin DJ. Bronchial epithelial compression regulates epidermal growth factor receptor family ligand expression in an autocrine manner. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(5):373-80.

Conrad SA, Zhang S, Arnold TC, Scott LK, Carden DL. Protective effects of low respiratory frequency in experimental ventilator-associated lung injury. *Crit Care Med.* 2005;33(4):835-40.

Costa MLG. *Remodelamento pulmonar na síndrome da angústia respiratória aguda e fibrose pulmonar idiopática: caracterização dos proteoglicanos biglican, lumican e versican* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Lesão e adaptação celulares. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, editores. *Robbins patologia estrutural e funcional*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p.1-32.

de Oliveira LR, Albertini Yagi CS, Figueiredo AC, Saldiva PH, Lorenzi-Filho G. Short-term effects of nCPAP on nasal mucociliary clearance and mucus transportability in healthy subjects. *Respir Med*. 2006;100(1):183-5.

Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1):294-323.

Duarte PAD, Bueno PCS, Bueno CE, Llages CM, Beppu OS. Lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (LPIV). In: Carvalho CR, editor. *Ventilação mecânica*. Editora Atheneu. São Paulo: Atheneu; 2003. v.2, p.291-310. Avançado. (Série clínicas brasileiras de medicina intensiva).

Eckerbom B, Lindholm CE, Mannting F. Mucociliary transport with and without the use of a heat and moisture exchanger. An animal study. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1991;35(4):297-301.

Even-Tzur N, Kloog Y, Wolf M, Elad D. Mucus secretion and cytoskeletal modifications in cultured nasal epithelial cells exposed to wall shear stresses. *Biophys J*. 2008;95(6):2998-3008.

Frank JA, Gutierrez JA, Jones K, Allen L, Dobbs L, and Matthay MA. Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-induced rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(2):242-9.

Gastaldi AC, Jardim JR, King M. The influence of temperature and length of time of storage of frog mucus samples. *Biorheology*. 2000;37(3):203-11.

Gattinoni L, Carlesso E, Cadringer P, Valenza F, Vagginelli F, Chiumello D: Physical and biological triggers of ventilator-induced lung injury and its prevention. *Eur Respir J Suppl*. 2003;22(47):15s-25s.

Gheber L, Korngreen A, Priel Z. Effect of viscosity on metachrony in mucus propelling cilia. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1998;39(1):9-20.

Giordano AM, Holsclaw D, Litt M. Mucus rheology and mucociliary clearance: normal physiologic state. *Am Rev Respir Dis*. 1978; 118(2):245-50.

Girod S, Zahm JM, Plotkowski C, Beck G, Puchelle E. Role of the physicochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium. *Eur Respir J*. 1992;5(4):477-87.

Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur Respir J*. 1999;13(5):1177-88.

Jeffery PK. Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *Am Rev Respir Dis*. 1983;128(2 Pt2):14-20.

King M, Gilboa A, Meyer FA, Silberberg A. On the transport of mucus and its rheologic simulants in ciliated system. *Am Rev Respir Dis*. 1974;110(6):740-45.

King M. Experimental models for studying mucociliary clearance. *Eur Respir J*. 1998;11(1):222-28.

King M, Festa E. Evolution of the frog palate model for mucociliary clearance (1970-1997). In: King M, Festa E, editors. *Cilia, mucus, and mucociliary interactions*. New York: Marcel Dekker; 1998. Cap.21, p.191-201.

King M. Physiology of mucus clearance. *Pediatr Respir Rev*. 2006; 7(Suppl 1):S212.

King M. Relationship between mucus viscoelasticity and ciliary transport in guaran gel/frog palte model system. *Biorheology*. 1980;17(3):249-54.

King M, Engel LA, Macklem PT. Effect of pentobarbital anesthesia on rheology and transport of canine tracheal mucus. *J Appl Physiol*. 1979;46(3):504-9.

King M, Zahm JM, Pierrot D, Vasquez-Girod S, Puchelle E. The role of mucus gel viscosity, spinability and adhesive properties in clearance by simulated cough. *Biorheology*. 1989;26(4):737-45.

Kondo CS, Macchionne M, Nakagawa NK, de Carvalho CR, King M, Saldiva PH, Lorenzi-Filho G. Effects of intravenous furosemide on mucociliary transport and rheological properties of patients under mechanical ventilation. *Crit Care*. 2002;6(1):81-7.

Konrad F, Schiener R, Marx T, Georgieff M. Ultrastructure and mucociliary transport of bronchial respiratory epithelium in intubated patients. *Intensive Care Med*. 1995;21(6):482-89.

Konrad F, Schreiber T, Brecht-Kraus D, Georgieff M. Mucociliary transport in ICU patients. *Chest*. 1994;105(1):237-41.

Konrad F, Schreiber T, Grünert A, Clausen M, Ahnefeld FW. Measurement of mucociliary transport velocity in ventilated patients. Short-term effect of general anesthesia on mucociliary transport. *Chest*. 1992;102(5):1377-83.

Kotani M, Kotani T, Ishizaka A, Fujishima S, Koh H, Tasaka S, Sawafuji M, Ikeda E, Moriyama K, Kotake Y, Morisaki H, Aikawa N, Ohashi A, Matsushima K, Huang YE, Takeda J. Neutrophil depletion attenuates interleukin-8 production in mild-overstretch ventilated normal rabbit lung. *Crit Care Med*. 2004a;32(2):514-19.

Kotani M, Kotani T, Li Z, Silbajoris R, Piantadosi CA, Huang YC. Reduced inspiratory flow attenuates IL-8 release and MAPK activation of lung overstretch. *Eur Respir J*. 2004b;24(2):238-46.

Kozma C, Macklin W, Cummins LM, Mauer R. Anatomy, physiology, and biochemistry of the rabbit. In: Weisbroth SH, Flatt RE, Krauss AL, editors. *The biology of the laboratory rabbit*. San Diego: Academic Press; 1974. v.3, p.49-72.

Ledowski T, Paech MJ, Patel B, Schug SA. Bronchial mucus transport velocity in patients receiving propofol and remifentanil versus sevoflurane and remifentanil anesthesia. *Anesth Analg*. 2006; 102(5):1427-30.

Leff AR, Schumacker PT. Biologia das vias aéreas condutoras. In: *Fisiologia respiratória: fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Editora Interlivros; 1996. Cap.12, p.168-88.

Lim LH, Wagner EM. Airway distension promotes leukocyte recruitment in rat tracheal circulation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(9):1068-74.

Lionetti V, Recchia FA, Ranieri VM. Overview of ventilator-induced lung injury mechanisms. *Curr Opin Crit Care*. 2005;11(1):82-6.

Lippmann M, Yeates DB, Albert RE. Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br J Ind Med*. 1980;37(4):337-62.

López-Aguilar J, Villagrà A, Bernabé F, Murias G, Piacentini E, Real J, Fernández-Segoviano P, Romero PV, Hotchkiss JR, Blanch L. Massive brain injury enhances lung damage in a isolated lung model of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med*. 2005;33(5):1077-83.

Lopez-Vidriero MT. Biochemical basis of physical properties of respiratory tract secretions. *Eur J Respir Dis Suppl*. 1987;153:130.

Lorenzi G, Böhm GM, Guimarães ET, Vaz MA, King M, Saldiva PH. Correlation between rheologic properties and in vitro ciliary transport of rat nasal mucus. *Biorheology*. 1992;29(4):433-40.

Lorenzi-Filho G, Saldiva PH. Aspectos funcionais do aparelho mucociliar. In: Tavares P, editor. *Atualização em fisiologia: respiração*. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1991. p.86-99.

Lorenzi-Filho G. *Efeitos da nebulização de solução salina e N-acetilcisteína sobre o muco respiratório de ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1993.

Macchione M, Lorenzi-Filho G, Guimaraes ET, Junqueira VB, Saldiva PH. The use of the frog palate preparation to assess the effects of oxidants on ciliated epithelium. *Free Radic Biol Med*. 1998;24(5): 714–21.

Macchione M, Guimarães ET, Saldiva PH, Lorenzi-Filho G. Methods for studying respiratory mucus and mucus clearance. *Braz J Med Biol Res*. 1995;28(11-12):1347-55.

Maeda Y, Fujino Y, Uchiyama A, Matsuura N, Mashimo T, Nishimura M. Effects of peak inspiratory flow on development of ventilator-induced lung injury in rabbits. *Anesthesiology*. 2004;101(3):722-8.

Matsui H, Wagner VE, Hill DB, Schwab UE, Rogers TD, Button B, Taylor RM 2nd, Superfine R, Rubinstein M, Iglewski BH, Boucher RC. A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18131-6.

Matthay MA, Bhattacharya S, Gaver D, Ware LB, Lim LH, Syrkina O, Eyal F, Hubmayr R. Ventilator-induced lung injury. in vivo and in vitro mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283(4):L678-82.

McShane D, Davies JC, Wodehouse T, Bush A, Geddes D, Alton EW. Normal nasal mucociliary clearance in CF children: evidence against a CFTR-related defect. *Eur Respir J*. 2004;24(1):95-100.

Meinhardt JP, Schmittner M, Herrmann P, Mailer M, Quintel M. Comparison of different inhalational perfluorocarbons in a rabbit model of acute lung injury. *ASAIO J*. 2005;51(1):85-91.

Morgenroth K. *The surfactant system of the lungs*. New York: Walter de Gruyter, Berlin; 1988.

Moriscot AS, Carneiro J, Abrahamsohn PA. O sistema respiratório. In: *Histologia para fisioterapia e outras áreas de reabilitação*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2004. Cap.11, p.163-74.

Mori SS. *Correlação da relação pressão-volume semi-estática do sistema respiratório e morfometria em ratos com lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.

Nakagawa KN. *Efeitos dos sistemas de umidificação artificial em cascata* [Dissertação]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo; 1997.

Nakagawa NK, Donato-Júnior F, Kondo CS, King M, Auler-Júnior JO, Saldiva PH, Lorenzi-Filho G. Effects of acute hypovolaemia by furosemide on tracheal transepithelial potential difference and mucus in dogs. *Eur Respir J*. 2004;24(5):805-10.

Nakagawa NK, Franchini ML, Driusso P, de Oliveira LR, Saldiva PH, Lorenzi-Filho G. Mucociliary clearance is impaired in acutely ill patients. *Chest*. 2005;128(4):2772-7.

Nakagawa NK, Macchione M, Petrolino HM, Guimarães ET, King M, Saldiva PH, Lorenzi-Filho G. Effects of a heat and moisture exchanger and a heated humidifier on respiratory mucus in patients undergoing mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2000;28(2):312-7.

Park J, Tschumperlin DJ. Chronic Intermittent Mechanical Stress Increases MUC5AC Protein Expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(4):459-66.

Papaiahgari S, Yerrapureddy A, Hassoun PM, Garcia JG, Birukov KG, Reddy SP: EGFR-activated signaling and actin remodeling regulate cyclic stretch-induced NRF2-ARE activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36(3):304–12.

Peatfield AC, Richardson PS. The action of dust in the airways on secretion into the trachea the. *J Physiol*. 1983;342:327-34.

Pompílio CE, Carvalho CRR. Ventilação mecânica: definição e classificação. In: Carvalho CR, editor. *Ventilação mecânica* editor. São Paulo: Atheneu; 2003. v.1, p.125-33. Básico (Série Clínicas Brasileiras de Medicina Intensiva).

Puchelle E, Zahm JM, Aug F. Viscoelasticity, protein content and ciliary transport rate of sputum in patients with recurrent and chronic bronchitis. *Biorheology*. 1981;18(3-6):659-66.

Puchelle E, Zahm JM, Jacquot J. A simple technique for measuring adhesion properties of human bronchial secretions. *Eur J Respir Dis.* 1987;71:281-2.

Rivero DH, Lorenzi-Filho G, Pazetti R, Jatene FB, Saldiva PH. Effects of bronchial transection and reanastomosis on mucociliary system. *Chest.* 2001;119(5):1510-5.

Rubin BK, Finegan B, Ramirez O, King M. General anesthesia does not alter the viscoelastic or transport properties of human respiratory mucus. *Chest.* 1990a;98(1):101-4.

Rubin BK, Ramirez O, King M. Mucus-depleted frog palate as a model for the study of mucociliary clearance. *J Appl Physiol.* 1990b;69(2):424-29.

Rubin BK. Surface properties of respiratory secretions: relationship to mucus transport. In: *Cilia, mucus, and mucociliary interactions*. New York: Marcel Dekker; 1998.

Rufino R, Lapa E, Silva JR. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol.* 2006;32(3):241-8.

Sackner MA, Hirsch J, Epstein S. Effect of cuffed endotracheal tubes on tracheal mucous velocity. *Chest.* 1975;68(6):774-77.

Saldiva PH. Aparelho mucociliar: aspectos funcionais e métodos de estudo. *J Pneumol.* 1990;16(3):161-70.

Saldiva PH, King M, Delmonte VL; Macchione M, Parada MA, Daliberto ML, Sakae RS, Criado PM, Silveira PL, Zin WA, Bohm GM. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ Res.* 1992;57(1):19-33.

Sanderson MJ, Charles AC, Dirksen ER. Mechanical stimulation and intercellular communication increases intracellular Ca^{2+} in epithelial cells. *Cell Regulation*. 1990;1(8):585-96.

Sanderson MJ, Dirksen ER. Mechanosensitivity of cultured ciliated cells from the mammalian respiratory tract: implications for the regulation of mucociliary transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(19):7302-06.

Savarese A, Rosinha MU. Anatomia do sistema respiratorio. In: Nakagawa NK, Viviani Bernabé V, editores. *Fisioterapia do sistema respiratório*. São Paulo: Savier; 2006. Cap.1, p.3-9.

Satir P, Sleight MA. The physiology of cilia and mucociliary interactions. *Annu Rev Physiol*. 1990;52:137-55.

Schans CP van der. Bronchial Mucus Transport. *Respiratory Care*. 2007;52(9):1150-58.

Schumacker PT. Straining to understand mechanotransduction in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(5):L881.

Scuri M, Sabater JR, Abraham WM. Hyaluronan blocks porcine pancreatic elastase-induced mucociliary dysfunction in allergic sheep. *J Appl Physiol*. 2007;102(6):2324-31.

Sibilla S, Tredici S, Porro A, Irace M, Guglielmi M, Nicolini G, Tredici G, Valenza F, Gattinoni L. Equal increases in respiratory system elastance reflect similar lung damage in experimental ventilator-induced lung injury. *Intensive Care Med*. 2002;28(2):196-203.

Silberberg A. On mucociliary transport. *Biorheology*. 1990;27(3-4):295-307.

Simonson DA, Adams AB, Wright LA, Dries DJ, Hotchkiss JR, Marini JJ. Effects of ventilatory pattern on experimental lung injury caused by high airway pressure. *Crit Care Med*. 2004;32(3):781-86.

Sinclair SE, Kregenow DA, Lamm WJ, Starr IR, Chi EY, Hlastala MP. Hypercapnic acidosis is protective in an in vivo model of ventilator-induced lung injury. *Am J Resp Crit Care Med*. 2002;166(3):403-8.

Sleigh MA, Blake JR, Liron N. The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137(3):726-41.

Suh GY, Koh Y, Chung MP, An CH, Kim H, Jang WY, Han J, Kwon OJ. Repeated derecruitments accentuate lung injury during mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2002;30(8):1848-52.

Suzuki S, Hotchkiss JR, Takahashi T, Olson D, Adams AB, Marini JJ: Effect of core body temperature on ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med*. 2004;32:144-9.

Teff Z, Priel Z, Gheber LA. The forces applied by cilia depend linearly on their frequency due to constant geometry of the effective stroke. *Biophys J*. 2008;94(1):298-305.

Terzi RGG, Carvalho CRR. Histórico da ventilação mecânica. In: Carvalho CR, editor. *Ventilação mecânica*. São Paulo: Atheneu; 2003. v.1, p.1-30. Básico (Série Clínicas Brasileiras de Medicina Intensiva).

Trawoger R, Kolobow T, Cereda M, Sparacino ME. Tracheal mucus velocity remains normal in healthy sheep intubated with a new endotracheal tube with a novel laryngeal seal. *Anesthesiology*. 1997; 86(5):1140-4.

Uhlig S. Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: stretching it too far? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 282(5):L892-6.

Verdugo P. Goblet cells secretion and mucogenesis. *Annu Rev Physiol*. 1990;52:157-76.

Villar J. Ventilator or physician-induced lung injury? *Minerva Anesthesiol*. 2005;71(6):255-8.

Vlahakis NE, Schroeder MA, Pagano RE, Hubmayr RD. The role of the cytoskeleton in deformation-induced alveolar epithelial wounding and repair. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:A379.

Volpe MS, Adams AB, Amato MB, Marini JJ. Ventilation patterns influence airway secretion movement. *Respir Care*. 2008;53(10):1287-94.

Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest*. 2009; 135(2):505-12.

Weisbroth SH, Flatt RE, Kraus AL. *The biology of the laboratory rabbit*. New York: Academic Press;1974.

Welsh MJ. Production and control of airway secretions. In: Fishman AP. *Pulmonary diseases and disorders*. New York: McGraw-Hill Book Company; 1988. v.1, p.113-8.

Welsh MJ. Electrolyte transport by airway epithelia. *Physiol Rev*. 1987; 67(4):1143-84.

West JB. Mecânica da respiração: como o pulmão é sustentado e movimentado. In: West JB, editor. *Fisiologia respiratória*. 6a ed. São Paulo: Manole; 2002. p.89-116.

Williams R, Rankin N, Smith T, Galler D, Seakins P. Relationship between the humidity and temperature of inspired gas and the function of the airway mucosa. *Crit Care Med*. 1996;24(11):1920-29.

Wiswell TE, Wiswell SH. The effect of 100% oxygen on the propagation of tracheobronchial injury during high-frequency and conventional mechanical ventilation. *Am J Dis Child*. 1990;144(5):560-564.

Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, Roelofs JJ, Juffermans NP, Schultz MJ. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care*. 2009;13(1):R1.

Wright DT, Cohn LA, Li H, Fischer B, Li CM, Adler KB. Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. *Environ Health Perspect*. 1994;102(Suppl 10):85-90.

Zayas JG, Man CG, King M. Tracheal mucus rheology in patients undergoing diagnostic bronchoscopy. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141(5 Pt1):1107-13.