PRISCILA AIKAWA

**Efeitos da ventilação mecânica e pressão positiva
no final da expiração sobre a microcirculação
mesentérica em ratos Wistar**

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

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Naomi Kondo Nakagawa

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Aikawa, Priscila

Efeitos da ventilação mecânica e pressão positiva no final da expiração sobre a microcirculação mesentérica em ratos Wistar / Priscila Aikawa. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Naomi Kondo Nakagawa.

Descritores: 1.Microcirculação 2.Respiração com pressão positiva 3.Respiração artificial 4.Leucócitos 5.Migração e rolagem de leucócitos 6.Mesentério 7.Pentoxifilina 8. Ratos Wistar

USP/FM/SBD-080/09

PRISCILA AIKAWA

**Efeitos da ventilação mecânica e pressão positiva
no final da expiração sobre a microcirculação
mesentérica em ratos Wistar**

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

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Naomi Kondo Nakagawa

São Paulo
2009

Agradecimentos

Em primeiro lugar e acima de tudo, agradeço meu pai Mamoru Aikawa, minha mãe Anita Aya Suzuki Aikawa e meu irmão Flávio Aikawa por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me dando forças pra realizar tudo que sempre almejei.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Naomi Kondo Nakagawa pela oportunidade de estar realizando este trabalho, por tantas outras oportunidades profissionais, pelo ensino, pela ajuda em meu crescimento tanto pessoal quanto profissional e, acima de tudo, pelo zelo que sempre teve comigo como pessoa.

Agradeço ao LIM-11, o laboratório onde pude realizar toda a segunda parte de meu trabalho e as pessoas que lá me ajudaram tanto. Professora Paulina Sannomiya com seu enorme conhecimento e sabedoria, Leila Peralta pela sua disponibilidade em fazer e conseguir tudo o que fosse preciso, Cristiano de Jesus Correia pela sua ajuda nos experimentos, pelas conversas e pela amizade.

Obrigada ao Laboratório de Toxicologia e Análises Clínicas e as pessoas que lá me ajudaram tanto pela disponibilidade do local de experimento, pela ajuda no aprendizado do “Be a Bá”, pela vivência e dias de riso, até mesmo,

dias em que tudo parecia dar errado. Em especial, a Professora Sandra Helena Poliselli Farsky.

Agradeço a pesquisadora Dra. Maria Aparecida de Oliveira pelos primeiros passos que demos, por nos ensinar a iniciar a técnica utilizada neste trabalho e por toda sua atenção e disponibilidade.

Agradeço ao pesquisador Dr. Rogério Pazetti pela colaboração no desenvolvimento de parte dos experimentos.

À Prof. Dra. Thaís Mauad pelo ensino da análise histológica dos pulmões, pela colaboração e pelas discussões sobre os resultados, a fim de sempre poder contribuir para um trabalho melhor.

Ao Prof. Dr. José Otávio Costa Auler Júnior, Dra. Denise Aya Otsuki e ao Gilberto de Mello Nascimento pelo processamento das análises de gases sanguíneos realizadas no Laboratório de Anestesiologia (LIM 8), em especial ao Gilberto, mais conhecido como Giba por sempre contribuir para a realização da análise.

Agradeço à Prof. Dra. Marisa Dolhnikoff e Ana Luiza Barreiros pela ajuda nas fotos das lâminas de pulmão realizadas no Museu de Imagens do Departamento de Patologia, e em especial à Ana pela paciência e pela maravilhosa recepção em me ajudar.

Agradeço às técnicas do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia: Celina Helena Araujo, Ana Paula Maria da Silva, Cássia Arruda, Kely Cristina Soares Bispo, Maria das Neves Souza e Rosely Ferreira de Siqueira, no processamento das lâminas, pelas orientações e pela atenção que tinham sempre que eu procurava-as.

Minha sincera gratidão a todos que colaboraram com a minha formação profissional e científica.

E ... agradeço a Deus por colocar no meu caminho um companheiro, que é cúmplice, amante e amigo, com quem hoje divido dias felizes, sonhos e expectativas, Felipe da Silva Paulitsch. Admirável pela sua inteligência (lógico porque me escolheu!), enorme garra e dedicação em tudo aquilo que faz, especialmente pelo carinho e preocupação constante comigo.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1.	INTRODUÇÃO	01
1.1	Microcirculação.....	03
1.2	Volume corrente baixo.....	06
1.3	Pentoxifilina.....	07
2.	OBJETIVOS	09
3.	MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1	Animais	12
3.2	Protocolo experimental	13
3.2.1	Fase I.....	13
3.2.2	Fase II.....	15
3.3	Anestesia.....	16
3.4	Canulação da artéria carótida e veia jugular.....	16
3.5	Traqueostomia e ventilação mecânica.....	17
3.6	Medidas hemodinâmicas e gasometria arterial.....	17
3.7	Microscopia intravital em mesentério.....	18
3.7.1	“Rollers”	21
3.7.2	Leucócitos aderidos.....	21
3.7.3	Leucócitos migrados.....	22

3.8	Medidas de mecânica pulmonar	22
3.9	Estudo histopatológico em pulmão.....	23
3.9.1	Quantificação do índice de edema perivascular.....	24
3.9.2	Quantificação de infiltrado leucocitário em parênquima pulmonar e região perivascular	24
3.10	Análise Estatística	26
4.	RESULTADOS	27
4.1	Fase I.....	28
4.1.1	Peso e pressão arterial média.....	28
4.1.2	Dados gasométricos do sangue arterial.....	29
4.1.3	Dados de microscopia intravital.....	30
4.1.4	Dados de análise histomorfométrica.....	34
4.2	Fase II.....	37
4.2.1	Peso e pressão arterial média.....	37
4.2.2	Dados do fluxo da artéria mesentérica.....	38
4.2.3	Dados gasométricos do sangue arterial.....	39
4.2.4	Dados de microscopia intravital.....	40
4.2.5	Dados de mecânica respiratória.....	44
4.2.6	Dados de análise histomorfométrica.....	47
5.	DISCUSSÃO	49
6.	CONCLUSÃO	56
7.	ANEXOS.....	59
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

RESUMO

Aikawa P. *Effects of mechanical ventilation and positive end-expiratory pressure on mesenteric microcirculation in Wistar rats* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 87p.

Ventilação mecânica (MV) com pressão positiva no final da expiração (PEEP) melhora a oxigenação sanguínea e oferta de oxigênio aos tecidos no tratamento da insuficiência respiratória aguda. No entanto, a pressão intratorácica elevada pode alterar o fluxo sanguíneo no mesentério que pode contribuir para complicações gastrointestinais durante a VM. Investigamos os efeitos da PEEP sobre as interações leucócito-endotélio durante a VM em ratos com pulmões normais e sem administração de fluido (Fase I) e os efeitos do volume corrente baixo (LTV) e pentoxifilina (PTX) sobre a microcirculação mesentérica (Fase II). O protocolo e resultados da Fase I são os seguintes: 44 ratos Wistar machos (~240g) foram anestesiados com pentobarbital (I.P., 50mg.kg⁻¹) e com isoflurane inalatório (1.5-2%) após instrumentação, e aleatoriamente divididos em (1) INTACTO (somente anestesia), (2) PEEP0 (PEEP=0 cmH₂O), (3) PEEP5 (PEEP=5 cmH₂O), e (4) PEEP10 (PEEP=10 cmH₂O). Os grupos PEEP foram submetidos à traqueostomia e VM com volume corrente de 10 ml.kg⁻¹, frequência respiratória de 70 rpm e fração inspirada de oxigênio de 1. Após 2-h de VM, realizamos laparotomia mediana e avaliamos as interações leucócito-endotélio por meio de microscopia intravital e inflamação pulmonar por meios histológicos. Não observamos alterações significantes na pressão sanguínea arterial média (PAM) entre os grupos ao longo do estudo. A pressão traqueal do grupo PEEP5 foi menor comparada com os grupos PEEP0 e PEEP10 (11, 15, e 16 cmH₂O, respectivamente; p<0.05). Após 2-h de VM, não houve diferenças significantes entre os grupos INTACTO, PEEP0 e PEEP5 no número de leucócitos “rollers” (118±9, 127±14 e 147±26 células/10minutos, respectivamente), aderidos (3±1, 3±1 e 4±2 células/100µm de comprimento de vênula, respectivamente), e migrados (2±1, 2±1 e 2±1 células/5,000µm², respectivamente) no mesentério. No entanto, PEEP10 aumentaram (p<0.05) o número de leucócitos “rollers” (188±15 células/10minutos), aderidos (8±1 células/100µm de vênula) e migrados (12±1 células/5,000 µm²). Observamos inflamação pulmonar nos grupos PEEP0 e PEEP10. O protocolo e resultados da Fase II são os seguintes: 57 ratos Wistar machos (~253g) foram anestesiados com pentobarbital (I.P., 50 mg.kg⁻¹), submetidos a traqueostomia, anestesia inalatória com isoflurane (1.5-2%), VM com PEEP de 10 cmH₂O, fração inspirada de oxigênio de 0,21, e aleatoriamente divididos em (1) LTV (7 ml.kg⁻¹), (2) volume corrente elevado (HTV, 10 ml.kg⁻¹), e (3) PTX (HTV+ PTX, 25 mg.kg⁻¹). Nós registramos a PAM, mecânica respiratória e gases sanguíneos arteriais no basal e após 2-h de VM. Realizamos laparotomia mediana e avaliamos as interações leucócito-endotélio no mesentério, fluxo de artéria mesentérica (FAM), mecânica respiratória e inflamação pulmonar. Não observamos diferenças entre os grupos no basal e após 2-h em PAM (113±15 vs 109± 6 mmHg). Após 2-h de VM, o FAM foi similar em todos os grupos (12.4±2.6 ml.min⁻¹). A pressão traqueal foi menor no grupo LTV (11.2±1.6 cmH₂O) comparada com HTV

(14.7 ± 1.1 cmH₂O) e PTX (14.1 ± 2.4 cmH₂O). Em todos os grupos a VM aumentou a elastância pulmonar ($\sim 22\%$, $p < 0.05$) e diminuiu a resistência de vias aéreas ($\sim 10\%$, $p < 0.05$). LTV e PTX apresentaram valores similares de leucócitos aderidos (5 ± 2 e 6 ± 4 células/100 μ m de vênula, respectivamente), e migrados (1 ± 1 e 2 ± 1 células/5,000 μ m², respectivamente). Contrariamente, HTV aumentou o número de aderidos (14 ± 4 leucócitos/100 μ m de vênula, $p < 0.05$) e migrados (9 ± 3 células/5,000 μ m², $p < 0.05$) no mesentério. O grupo HTV apresentou infiltrado neutrofílico e edema pulmonar. Em conclusão, nosso estudo mostrou que a pressão intratorácica elevada é prejudicial para a microcirculação mesentérica e pulmões no modelo experimental de ratos com pulmões normais e pressão sanguínea sistêmica estável, LTV previne alterações microcirculatórias e pulmonares, e a administração precoce de PTX atenua as interações leucócito-endotélio no mesentério e inflamação pulmonar durante a VM. Esses achados podem ter relevância na compreensão das complicações induzidas pela VM e prognóstico.

Descritores: microcirculação, respiração com pressão positiva, respiração artificial, leucócitos, migração e rolagem de leucócitos, mesentério, pentoxifilina, ratos Wistar.

SUMMARY

Aikawa P. *Effects of mechanical ventilation and positive end-expiratory pressure on mesenteric microcirculation in Wistar rats* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 87p.

Mechanical ventilation (MV) with positive end expiratory pressure (PEEP) improves blood oxygenation and tissue oxygen delivery during treatment of acute respiratory failure. However, high intrathoracic pressure may alter blood flow at mesentery, which may contribute to gastrointestinal complications during MV. We investigated the effects of PEEP on mesenteric leukocyte-endothelial interactions during MV in rats with normal lungs and without fluid administration (Phase I) and the effects of low-tidal volume (LTV) and pentoxifylline (PTX) on mesenteric microcirculation (Phase II). The protocol and results of Phase I are the following: 44 male Wistar rats (~240g) were anesthetized with pentobarbital (I.P., 50mg.kg⁻¹) and inhaled isoflurane (1.5-2%) after instrumentation, and randomly divided in (1) NAIVE (only anesthesia), (2) PEEP0 (PEEP=0 cm H₂O), (3) PEEP5 (PEEP=5 cmH₂O), and (4) PEEP10 (PEEP=10 cmH₂O). PEEP groups were submitted to tracheostomy and MV with tidal volume of 10 ml.kg⁻¹, respiratory rate of 70 rpm and inspired oxygen fraction of 1. After 2-hrs of MV, we performed a median laparotomy and evaluated leukocyte-endothelial interactions at the mesentery and lung inflammation by histology. We did not observe significant changes mean arterial blood pressure (MABP) among groups throughout the study. Tracheal pressure in PEEP5 was lower compared with PEEP0 and PEEP10 groups (11, 15, and 16 cmH₂O, respectively; p<0.05). After 2-hrs of MV, there were no differences among NAIVE, PEEP0 e PEEP5 groups in the number of rollers (118±9, 127±14 and 147±26 cells/10 minutes, respectively), adherent leukocytes (3±1, 3±1 and 4±2 cells/100 µm venule, respectively), and migrated leukocytes (2±1, 2±1 and 2±1 cells/5,000 µm², respectively) at the mesentery. However, PEEP10 increased (p<0.05) the number of rolling (188±15 cells/10min), adherent (8±1 cells/100 µm) and migrated leukocytes (12±1 cells/5,000 µm²). We observed lung inflammation in PEEP0 and PEEP10 groups. The protocol and results of Phase II are the following: 57 male Wistar rats (~253g) were anesthetized with pentobarbital (I.P., 50 mg.kg⁻¹), submitted to tracheostomy, inhaled anesthesia with isoflurane (1.5-2%), MV with PEEP of 10 cmH₂O, inspired oxygen fraction of 0.21, and randomly divided in (1) LTV (7 ml.kg⁻¹), (2) High-tidal volume (HTV, 10 ml.kg⁻¹), and (3) PTX (HTV+ PTX, 25 mg.kg⁻¹). We registered MABP, respiratory mechanics and arterial blood gases at baseline and after 2-hrs of MV. We performed a median laparotomy and evaluated leukocyte-endothelial interactions, mesenteric artery flow (MAF), respiratory mechanics and lung inflammation. We did not observe significant differences among groups at baseline and after 2-hrs in MABP (113±15 vs 109± 6 mmHg). After 2-hrs, MAF was similar in all groups (12.4±2.6 ml.min⁻¹). Tracheal pressure was lower in LTV (11.2±1.6 cmH₂O) compared with HTV (14.7±1.1 cmH₂O) and PTX (14.1±2.4 cmH₂O). In all groups MV increased pulmonary elastance (22%, p<0.05) and decreased airway resistance (10%, p<0.05). LTV and PTX presented similar values of adherent (5±2 and 6±4 cells/100µm venule, respectively), and

migrated leukocytes (1 ± 1 and 2 ± 1 cells/ $5,000\mu\text{m}^2$, respectively). On the contrary, HTV increased the number of adherent (14 ± 4 leukocytes/ $100\mu\text{m}$ venule, $p<0.05$) and migrated leukocytes (9 ± 3 cells/ $5,000\mu\text{m}^2$, $p<0.05$) in the mesentery. HTV presented lung neutrophil infiltration and edema. In conclusion, our study showed that high intrathoracic pressure is harmful to mesenteric microcirculation and lungs in the experimental model of rats with normal lungs and stable systemic blood pressure, LTV prevents microcirculatory and pulmonary alterations, and early administration of PTX attenuates leukocyte-endothelial interactions at the mesentery and lung inflammation during MV. These findings may have relevance for complications MV-induced and outcome.

Descriptors: microcirculation, respiration with positive pressure, artificial ventilation, leukocytes, migration and rolling, mesentery, pentoxifylline, Wistar rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia modificada de Hiratsuka M & Nakagawa NK	03
Figura 2. Protocolo experimental da FASE I.....	13
Figura 3. Protocolo experimental da FASE II.....	15
Figura 4. Preparação do mesentério exposto em plataforma translúcida para observação da microcirculação.....	19
Figura 5. Sistema de microscopia intravital composto dos seguintes equipamentos: uma televisão, um gravador de imagens, um computador contendo um programa de imagens, um microscópio e uma câmera	20
Figura 6. Fotomicrografia da visualização em microscópio óptico do retículo de pontos e retas (área conhecida de $10.000\mu\text{m}^2$) para realização da quantificação do infiltrado neutrofílico em pulmão e edema perivascular.....	25
Figura 7. Pressão arterial média (PAM) durante o período de estudo nos grupos INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10.	29
Figura 8. Fotomicrografias representativas de vênulas pós-capilares na microcirculação mesentérica, nas quais (A) INTACTO, (B) PEEP0, (C) PEEP5 e (D) PEEP10.....	31
Figura 9. “Rollers” (número de células/10 minutos) em vênulas pós- capilares no mesentério (média $\pm$ DP) nos grupos INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10 ($\dagger$, $p < 0,05$ vs outros grupos).....	33

Figura 10. Leucócitos aderidos (número de células/100 μm da vênula) em vênulas pós-capilares no mesentério (média $\pm$ DP) nos grupos INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10 ($\dagger$, $p < 0,05$ vs outros grupos)	33
Figura 11. Leucócitos migrados (número de células/5,000 μm^2) em vênulas pós-capilares no mesentério (média $\pm$ DP) nos grupos INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10 ($\dagger$, $p < 0,05$ vs outros grupos)	34
Figura 12. Fotomicrografias histológicas de pulmões de ratos. Grupos correspondentes (A) INTACTO; (B) PEEP0; (C) PEEP5 e (D) PEEP10. As setas indicam a formação de edema em região perivascular vistas em cortes transversais. Aumento final 100X, HE.	36
Figura 13. Pressão arterial média $\pm$ DP durante o período de estudo nos grupos LTV, HTV e PTX.	38
Figura 14. Fotomicrografias representativas de vênulas pós-capilares na	41
Figura 15. “Rollers” (número de células/10 minutos) em vênulas pós-capilares no mesentério (média $\pm$ DP) nos grupos LTV, HTV e PTX. *, $p < 0.01$ vs LTV.....	42
Figura 16. Leucócitos aderidos (número de células/100 μm da vênula) em vênulas pós-capilares no mesentério (média $\pm$ DP) nos grupos LTV, HTV e PTX. $\dagger$, $p < 0.01$ vs outros grupos.	43

Figura 17. Leucócitos migrados (número de células/5,000 μm^2) em vênulas pós-capilares no mesentério (média $\pm$ DP) nos grupos LTV, HTV e PTX. †, $p < 0.01$ vs outros grupos.	43
Figura 18. Fotomicrografias histológicas de pulmões de ratos. Grupos correspondentes (A) LTV; (B) HTV e (C) PTX. As setas indicam a formação de edema em região perivascular vistas em cortes transversais, mais evidente em (B) HTV. Aumento final 100X, HE.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias, desvios-padrão (DP) de pressão arterial média (PAM) no basal, 30, 60, 90 e 120 minutos de VM.....	28
Tabela 2. Médias, desvios-padrão (DP) das variáveis: pH e gases sanguíneos nos grupos PEEP0, PEEP5 e PEEP10 (*, $p < 0,05$ vs basal).....	30
Tabela 3. Médias, desvios-padrão (DP) das variáveis de interações leucócito-endotélio: rollers, leucócitos aderidos e leucócitos migrados após 2 horas de VM nos grupos INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10 ($p < 0,05$).....	32
Tabela 4. Médias $\pm$ desvios-padrão (DP) das variáveis: infiltração neutrofílica em parênquima pulmonar e infiltração neutrofílica e edema em região perivascular nos grupos INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10 após 2 horas de VM (*, $p < 0.05$ vs INTACTO; †, $p < 0.05$ vs outros grupos).	35
Tabela 5. Médias, desvios-padrão (DP) da variável pressão arterial média antes e durante as 2 horas de VM (*, $p < 0,05$ vs basal).	37
Tabela 6. Médias, desvios-padrão (DP) da variável: velocidade do fluxo sanguíneo mesentérico após 2 horas de VM nos grupos LTV, HTV e PTX.....	39
Tabela 7. Médias, desvios-padrão (DP) das variáveis: pH e gases sanguíneos nos grupos LTV, HTV e PTX (*, $p < 0.05$ vs basal; †, $p < 0.05$ vs outros grupos no mesmo período).....	40

Tabela 8. Médias, desvios-padrão (DP) das variáveis de interações leucócito-endotélio: rollers, leucócitos aderidos e leucócitos migrados após 2 horas de VM nos grupos LTV, HTV e PTX (*, $p < 0,05$ vs LTV; †, $p < 0,05$ vs outros grupos).	41
Tabela 9. Médias, desvios-padrão (DP) da variável: pressão traqueal nos tempos basal e 2 horas de VM nos grupos da Fase II (*, $p < 0,05$ vs LTV no mesmo tempo; ¥, $p < 0,05$ vs basal).	44
Tabela 10. Médias, desvios-padrão (DP) da variável: elastância do sistema respiratório nos tempos basal e 2 horas de VM nos grupos da Fase II (*, $p < 0,05$ vs basal).	45
Tabela 11. Médias, desvios-padrão (DP) da variável: resistência do sistema respiratório nos tempos basal e 2 horas de VM nos grupos da Fase II (*, $p < 0,05$ vs basal).	46
Tabela 12. Quantificação de neutrófilos no parênquima pulmonar e na região perivascular e índice de edema em região perivascular (*, $p < 0.05$ vs outros grupos; †, $p < 0.05$ vs LTV).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ers – Elastância do sistema respiratório

FAM – Fluxo de artéria mesentérica

F_IO₂ – Fração inspirada de oxigênio

f – Frequência respiratória

h - Hora

HE – Hematoxilina e eosina

HTV – Volume corrente elevado

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular-1

IP – Administração intraperitoneal

LPA – Lesão pulmonar aguda

LTV – Volume corrente baixo

PaCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico no sangue arterial

PaO₂ – Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial

PAM – Pressão sanguínea arterial média

PEEP – Pressão positiva ao final da expiração

pH – Potencial de hidrogenação

PMN – Células polimorfonucleares

Ptr – Pressão traqueal

PTX – Pentoxifilina

rpm - Respirações por minuto

Rrs – Resistência do sistema respiratório

t – Tempo

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

V – Volumes pulmonares

V' – Fluxo

VM – Ventilação Mecânica

1. INTRODUÇÃO

A ventilação mecânica (VM) é um método de suporte de vida e tratamento da insuficiência respiratória aguda. A pressão positiva no final da expiração (PEEP) é um recurso terapêutico durante a VM e tem como objetivos principais melhorar a oxigenação arterial e a oferta de oxigênio aos tecidos, e é freqüentemente utilizada em pacientes com hipoxemia e em pacientes gravemente enfermos.^{1,2}

A VM e PEEP aumentam a pressão intratorácica que, por sua vez, afeta praticamente todos os órgãos e sistemas do corpo promovendo alterações pulmonares e cardiovasculares^{3,4}. Sobre os pulmões, o estresse cíclico da VM induz efeitos adversos como ativação de macrófagos, neutrófilos e células endoteliais,^{5,6} liberação de mediadores inflamatórios,⁷ alterações na permeabilidade vascular,^{8,9} aumento na expressão das moléculas de adesão,¹⁰ e seqüestro leucocitário.⁶ Sobre o sistema cardiovascular, a VM e PEEP podem promover diversos efeitos adversos como redução do retorno venoso, aumento da resistência vascular pulmonar, desvio do septo interventricular direito-esquerdo e redução do débito cardíaco.¹¹ Como consequência da redução do retorno venoso e débito cardíaco, o fluxo sanguíneo é redistribuído, de regiões periféricas como pele, anexos, músculos esqueléticos, e inclusive do trato gastrointestinal dirigindo-se para órgãos vitais como cérebro e coração.

As características da vasculatura esplâncnica¹² tornam o trato gastrointestinal vulnerável aos efeitos circulatórios adversos relacionados com a VM e PEEP. A hipoperfusão do trato gastrointestinal pode ter um papel relevante na fisiopatologia das complicações gastrointestinais

observadas em pacientes submetidos à VM, sendo prevalentes o sangramento da mucosa, diarreia, isquemia mesentérica, falência gastrointestinal e sepse.^{13,14,15}

1.1 MICROCIRCULAÇÃO

A microcirculação é composta de uma rede de vasos com calibre menor que 100 µm e envolvem arteríolas, capilares e vênulas pós-capilares (Figura 1).

Figura 1. Fotomicrografia modificada de Hiratsuka M & Nakagawa NK¹⁶

A integridade microcirculatória é um elemento chave para a oxigenação tecidual e função adequada dos órgãos. Disfunções microcirculatórias têm papel fundamental no prognóstico de pacientes gravemente enfermos.^{17,18} Os leucócitos circulam pela corrente sanguínea e representam uma das primeiras barreiras do organismo contra agentes agressores. As bases celulares e moleculares para o recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação são altamente complexas e multifatoriais. No entanto, há evidências suficientes na literatura que acentuam os elementos essenciais no desenvolvimento desse processo.

O recrutamento e acúmulo de leucócitos no local de infecção e/ou lesão podem ser estimulados por redução do fluxo sanguíneo, liberação de mediadores inflamatórios e ativação de leucócitos e endotélio.^{19,20,21,22,23,24,25,26} A migração leucocitária para o local de lesão envolve uma série de interações leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares, mediadas por moléculas de adesão sobre o endotélio vascular e leucócitos. Essas moléculas participam da redução de velocidade dos leucócitos, saída dos capilares e entrada nas vênulas pós-capilares, que é o maior local de células de interações leucócito-endotélio. O rolamento é o primeiro passo das interações leucócito-endotélio e é mediado pelas selectinas (E, P e L) que reduzem a velocidade dos leucócitos em relação aos eritrócitos, iniciando uma orientação periférica dos leucócitos ao longo da parede do endotélio vascular denominada de marginação leucocitária. Em seguida, os leucócitos que rolam sobre o endotélio podem se aderir firmemente à parede endotelial e “estacionar”, processo que é mediado pela

interação das integrinas (β_2 integrinas) no leucócito com as moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) do endotélio. Caso ocorra a geração de sinal quimiotático no compartimento perivascular, os leucócitos firmemente aderidos à parede dos vasos podem inserir pseudópodes nas junções entre as células endoteliais (diapedese), ultrapassar a membrana basal e seguir para esse tecido perivascular. A locomoção dos leucócitos orientada ao longo de um gradiente químico conduz a um acúmulo de leucócitos no local de lesão.^{27,28}

As interações leucócito-endotélio são essenciais para uma efetiva defesa contra a invasão do agente nocivo. Entretanto, uma hiperativação e acúmulo leucocitário no tecido estão, geralmente, associados a uma maior liberação de citocinas inflamatórias, resultando em resposta imune pró-inflamatória exacerbada que, por sua vez, pode contribuir para uma lesão microvascular difusa e subsequente destruição endotelial.^{20,28}

A microscopia intravital é uma técnica de observação *in vivo* da microcirculação, isto é, permite a observação em tempo real do fluxo sanguíneo em microvasos (arteríolas e vênulas com diâmetro menor que 100 μm), mudanças na permeabilidade vascular, e também permite a avaliação do comportamento leucocitário: rolamento, adesão ao endotélio e migração de leucócitos para o tecido perivascular diante de um processo inflamatório.^{28,29,30,31,32,34} A microscopia intravital é uma ferramenta útil para analisar complexas interações biológicas em vários estudos experimentais de inflamação sistêmica, como choque, reperfusão e sepse e, além disso, tem sido utilizada para testar novas estratégias profiláticas e terapêuticas

que têm o objetivo de prevenir ou atenuar manifestações de disfunções microvasculares e celulares.^{29,33,34}

1.2 VOLUME CORRENTE BAIXO

A lesão pulmonar aguda induzida pelo ventilador pode resultar de hiperdistensão pulmonar, forças de cisalhamento, e alterações de surfactante.^{9,35} Estudos experimentais com animais mostram que pulmões normais submetidos à VM com volumes correntes elevados (acima de 12 ml/kg) resultam em edema pulmonar e lesão alveolar difusa.^{36,37,38} O uso de volume corrente baixo (LTV) e pressão de platô inspiratório limitada em 30 cmH₂O durante a VM de pacientes com insuficiência respiratória é denominada de estratégia protetora pulmonar, e tem sido associada à redução da taxa de mortalidade em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo além de redução de níveis séricos e pulmonar de mediadores inflamatórios.^{39,40,41,42} Recentemente, dos Santos e colaboradores³⁵ mostraram a possibilidade de identificação das causas biofísica e bioquímica de lesão pulmonar aguda induzida por choque hemorrágico/reperfusão ou sepse associados à VM com LTV de 6 ml/kg e volume corrente elevado (HTV) de 12 ml/kg por meio de análise do perfil genético.

Em pacientes criticamente enfermos internados em unidades de terapia intensiva,^{43,44} estudos mostram que a VM com HTV pode ser um

fator de risco para o desenvolvimento de lesão pulmonar aguda em pacientes sem doença pulmonar prévia à VM. Por outro lado, há estudos que relatam redução significativa do fator de necrose tumoral (TNF- α) em lavado broncoalveolar de pacientes com pulmões normais submetidos à VM com LTV (6 ml/kg) comparado com o HTV (12 ml/kg) durante cirurgias de grande porte de longa duração (6 h de VM).⁴⁵ Porém, os autores relatam que essa redução de mediador pró-inflamatório não foi acompanhado de benefícios clínicos. Portanto, a estratégia protetora (LTV e PEEP) parece ter papel anti-inflamatório na insuficiência respiratória aguda, porém seu papel ainda está pouco esclarecido na VM de sujeitos com pulmões normais.

1.3 PENTOXIFILINA

Terapias dirigidas para a melhora da microcirculação e perfusão celular podem contribuir no tratamento e prognóstico clínico. A pentoxifilina (PTX) é um inibidor não específico da fosfodiesterase, um derivado da metilxantina e tem sido associada ao aumento da deformabilidade e flexibilidade da membrana dos eritrócitos,⁴⁶ redução da viscosidade sanguínea,⁴⁷ inibição da liberação de citocinas e modulação da função do neutrófilo, atuando na melhora da microcirculação em áreas com comprometimento do fluxo sanguíneo.^{48,49} Vários estudos têm mostrado os efeitos benéficos da PTX sobre a permeabilidade intestinal, translocação bacteriana, ativação de neutrófilos, disfunção endotelial, fluxo sanguíneo,

oxigenação pulmonar e sobrevida em modelos experimentais de lesão pulmonar aguda,^{50,51,52,53} choque hemorrágico e reperfusão^{33,54} e sepse.⁵⁵ Por outro lado, há outros estudos que não relatam melhora da sobrevida em modelo animal de falência de múltiplos órgãos e sistemas⁵⁶ e em pacientes com choque séptico grave.⁵⁷

Nós hipotetizamos que a VM e diferentes níveis de PEEP têm efeitos sobre as interações leucócito-endotélio no mesentério de animais com pulmões normais, e que o LTV e a pentoxifilina, devido às suas propriedades hemorreológicas e imunomodulatórias, podem ter efeitos benéficos sobre a microcirculação mesentérica.

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram:

- 1) Definir um modelo experimental de observação da microcirculação mesentérica em ratos Wistar com pulmões normais sob VM e PEEP;
- 2) Investigar os efeitos de diferentes níveis de PEEP (0, 5 e 10 cmH₂O) sobre a microcirculação mesentérica através da microscopia intravital, e sobre os pulmões através da histologia para quantificação de edema e de infiltrado leucocitário em região perivascular e no parênquima pulmonar em ratos Wistar submetidos à VM com volume corrente de 10 ml/kg e fração inspirada de oxigênio de 100%;
- 3) Investigar os efeitos de LTV (7 ml/kg) e PTX sobre a microcirculação mesentérica por meio de microscopia intravital e ultrassom-doppler, e sobre os pulmões por meio de mecânica do sistema respiratório e quantificação de edema e de infiltrado leucocitário em região perivascular e no parênquima pulmonar em ratos Wistar submetidos à ventilação mecânica com PEEP de 10 cmH₂O e fração inspirada de oxigênio de 21%.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HCFMUSP), sob Protocolo de Pesquisa número SDC 2674/05/094.

Os animais foram tratados de acordo com as diretrizes do National Institute of Health – USA (Guide for care and use of laboratory animals, 1985) no cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório.

Os experimentos foram realizados em duas fases (FASE I e FASE II) no Laboratório de Investigação Médica (LIM– 11) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 ANIMAIS

Utilizamos 101 ratos adultos machos, linhagem Wistar com peso entre 200 e 300 g, provenientes do biotério do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os animais foram mantidos no biotério, com livre acesso à ração e água, em ambiente controlado para temperatura, umidade e exposição à luz artificial, com ciclos claros e ciclos escuros de 12 horas. Após a realização dos experimentos, todos os animais foram sacrificados por exsanguinação através da secção da artéria aorta abdominal.

3.2 PROTOCOLLO EXPERIMENTAL

Desenvolvemos o protocolo experimental em duas fases distintas, sendo 44 animais na FASE I (Figura 2) e 57 animais na FASE II (Figura 3).

3.2.1 FASE I

Figura 2. Protocollo experimental da FASE I

Na FASE I, utilizamos 44 animais que foram aleatoriamente divididos em quatro grupos:

(1) INTACTO: os animais foram submetidos somente à anestesia intraperitoneal;

(2) PEEP0: os animais foram submetidos à anestesia, canulação de artéria carótida e veia jugular, traqueostomia e ventilados mecanicamente com PEEP de 0 cmH₂O, volume corrente de 10 ml/kg, frequência respiratória de 70 rpm e fração inspirada de oxigênio de 100%;

(3) PEEP5: os animais foram submetidos à anestesia, canulação de artéria carótida e veia jugular, traqueostomia e ventilados mecanicamente com PEEP de 5 cmH₂O, volume corrente de 10 ml/kg, frequência respiratória de 70 rpm e fração inspirada de oxigênio de 100%;

(4) GRUPO PEEP10: os animais foram submetidos à anestesia, canulação de artéria carótida e veia jugular, traqueostomia e ventilados mecanicamente com PEEP de 10 cmH₂O, volume corrente de 10 ml/kg, frequência respiratória de 70 rpm e fração inspirada de oxigênio de 100%.

3.2.2 FASE II

Figura 3. Protocolo experimental da FASE II

Na FASE II, utilizamos 57 animais que foram aleatoriamente divididos em três grupos:

- (1) LTV: os animais foram submetidos à anestesia, canulação da artéria carótida e veia jugular, traqueostomia e à ventilação mecânica com PEEP de 10 cmH₂O, volume corrente de 7 ml/kg, frequência respiratória de 85 rpm (para manutenção de normocapnia) e fração inspirada de 21%;
- (2) HTV: os animais foram submetidos à anestesia, canulação da artéria carótida e veia jugular, traqueostomia e à ventilação mecânica com PEEP de

10 cmH₂O, volume corrente de 10 ml/kg, frequência respiratória de 70 rpm e fração inspirada de 21%;

(3) PTX: os animais foram submetidos à anestesia, canulação da artéria carótida e veia jugular, traqueostomia e à ventilação mecânica com PEEP de 10 cmH₂O, volume corrente de 10 ml/kg, frequência respiratória de 70 rpm, fração inspirada de 21% e administração em bolus de pentoxifilina (25 mg/kg; Trental[®], Hoechst Marion Roussel, São Paulo, S.P., Brasil) durante 1 minuto no tempo basal de VM.

3.3 ANESTESIA

Anestesiamos os animais com pentobarbital sódico (I.P., 50 mg.Kg⁻¹), e após a traqueostomia, mantivemos o plano anestésico até o sacrifício dos animais com isoflurano a 1,5 a 2% (Forane, Abbott, Buenos Aires, Argentina), com exceção dos animais do grupo INTACTO que foram submetidos apenas à anestesia intraperitoneal.

3.4 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA CARÓTIDA E VEIA JUGULAR

Posicionamos os ratos em decúbito dorsal, e os submetemos à tricotomia da região cervical anterior. Realizamos assepsia local com iodopovidine, dissecamos e canulamos a artéria carótida direita com catéter

de polietileno (PE50). Em seguida, dissecamos e canulamos a veia jugular direita com outro cateter de polietileno (PE50).

3.5 TRAQUEOSTOMIA E VENTILAÇÃO MECÂNICA

Com exceção dos animais do grupo INTACTO da FASE I, traqueostomizamos todos os outros animais com tubo de polipropileno (18 gauge) e, em seguida os submetemos à VM (Modelo 683, Harvard Instruments, MA, USA) durante 2 horas.

3.6 MEDIDAS HEMODINÂMICAS E GASOMETRIA ARTERIAL

Realizamos as medidas de pressão arterial média (PAM) com um transdutor de pressão (Acqknowledge System MP100, Biopac, Goleta, CA, USA) conectado ao cateter da artéria carótida, e as registramos na Fase I os seguintes tempos: (a) basal, (b) 30 minutos, (c) 60 minutos, (d) 90 minutos e (e) 120 minutos, e na Fase II, apenas basal e 2 h.

A análise de fluxo sanguíneo de artéria mesentérica (FAM) foi realizada apenas na FASE II após 2 horas de VM. Dissecamos a artéria mesentérica superior e posicionamos delicadamente um sensor ao redor da artéria (Transonic Inc., Ithaca, NY, USA) com propriedades de ultrassom-doppler. Apresentamos os valores de PAM em mmHg e o FAM em ml.s^{-1} .

Na FASE I e na FASE II, os gases sanguíneos arteriais foram analisados (Radiometer ABL 555, Radiometer Medical, Copenhagen, Dinamarca) em amostras de sangue dos animais retiradas do catéter de artéria carótida nos tempos basal e 2 horas de VM.

3.7 MICROSCOPIA INTRAVITAL EM MESENTÉRIO

Para a análise das interações leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares, realizamos a preparação cirúrgica do mesentério como previamente descrito.^{29,33,34} Resumidamente, após laparotomia mediana com exposição do mesentério, posicionamos os animais em decúbito lateral (Figura 4) sobre uma plataforma translúcida para a observação *in vivo* da microcirculação mesentérica e mantivemos os animais aquecidos à uma temperatura de 37°C. Irrigamos o mesentério com solução de Krebs a 37°C e o cobrimos com uma membrana impermeável (Saran Wrap, Dow Chemical Co, UK) para prevenir eventual desidratação do tecido sob visualização microscópica.

Figura 4. Preparação do mesentério exposto em plataforma translúcida para observação da microcirculação

Após 10 minutos de estabilização, avaliamos as interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica em tempo real, utilizando um computador com software de aquisição de imagens (Axiovision 4.1, Carl Zeiss Co, München-Hallbergmoos, Germany). Gravamos as imagens para reanálise posterior. Em cada animal, selecionamos três a cinco vênulas pós-capilares com diâmetros entre 9 a 20 μm na Fase I e entre 17 a 24 μm na Fase II, e as examinamos.

Incorporamos (Figura 5) uma câmera colorida CCD (TK-C1380U, JVC Co, Tokyo, Japan) ao microscópio triocular (Axioplan 2, Carl Zeiss Co, München-Hallbergmoos, Germany) com aumento de 1960x. Observamos as imagens da microcirculação mesentérica em um monitor de televisão (Sharp,

Brasil) e em um monitor de um microcomputador (SyncMaster 753DFX, Samsung, Manaus, Brazil), simultaneamente.

Figura 5. Sistema de microscopia intravital composto dos seguintes equipamentos: uma televisão, um gravador de imagens, um computador contendo um programa de imagens, um microscópio e uma câmera

3.7.1 “ROLLERS”

Definimos como “rollers” as células brancas que se movem em velocidade menor que os eritrócitos no determinado microvaso em observação. Determinamos o número de “rollers” pela média do número de células que passavam por uma linha perpendicular ao vaso durante 10 minutos,²⁸ em segmento de vênula pós-capilar. O resultado final de “rollers” foi expresso em média do número de leucócitos/10 minutos $\pm$ desvio-padrão (DP).

3.7.2 LEUCÓCITOS ADERIDOS

Definimos como leucócitos aderidos aqueles que permaneciam estacionados no endotélio venular por um período acima de 30 segundos.²⁸ Determinamos o número de leucócitos aderidos durante 10 minutos em uma extensão de 100 μ m de vênula. O resultado final de leucócitos aderidos foi expresso em média do número de leucócitos $\pm$ DP/100 μ m de comprimento de vênula.

3.7.3 LEUCÓCITOS MIGRADOS

Definimos como leucócitos migrados aqueles que se direcionavam para o tecido perivascular após o final de cada tempo em uma área de 5000 μm^2 , realizamos em três campos diferentes.^{29,33,34} O resultado final de células migradas foi expresso em média do número de leucócitos $\pm$ DP/5000 μm^2 .

3.8 MEDIDAS DE MECÂNICA PULMONAR

Medimos os seguintes parâmetros de mecânica pulmonar: (a) pressão traqueal, (b) resistência e (c) elastância do sistema respiratório nos tempos basal e 2 h de VM.

Medimos a pressão traqueal (P_{tr} ; cmH_2O) através de um transdutor de pressão diferencial 142PC05D (Honeywell, Freeport, IL) conectado à cânula traqueal. O fluxo (V') foi obtido por um pneumotacógrafo Fleish 4-0 (OEM Medical Inc., Richmond, VI) conectado à cânula traqueal e a um transdutor de pressão diferencial (Honeywell 163PC01D36). Alterações de volumes pulmonares (V) foram obtidos pela integração eletrônica do sinal de fluxo aéreo. Para cada animal, medimos dez ciclos respiratórios. Registramos os dados de P_{tr} , V' e V em um computador. Obtivemos os dados de elastância ($\text{cmH}_2\text{O}.\text{ml}^{-1}$) e resistência ($\text{cmH}_2\text{O}.\text{ml}^{-1}.\text{s}$) do sistema respiratório através da equação do movimento do sistema respiratório: $P_{\text{tr}}(t) = E_{\text{rs}}.V(t) + R_{\text{rs}}.V'(t)$.

Onde t é o tempo, V é o volume pulmonar, E_{rs} é a elastância do sistema respiratório e R_{rs} é a resistência do sistema respiratório.⁵⁸

3.9 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO EM PULMÃO

Após 2 h de VM, sacrificamos os animais por meio de exsanguinação da artéria aorta abdominal. Após toracotomia, infundimos 20 ml de soro fisiológico 0,9% no ápice do coração do animal para a lavagem dos pulmões através das artérias pulmonares, em seguida, infundimos 20 ml de formaldeído a 10% para iniciar a fixação do tecido. Retiramos os pulmões em monobloco e os mergulhamos em solução de formaldeído a 10% por 48 horas. Retiramos os pulmões, e seccionamos o lobo inferior direito em três fragmentos transversais e o lobo superior esquerdo seccionado em três fragmentos longitudinais. Desidratamos os fragmentos de pulmões em etanol 70%, 95% e 100%, realizamos a diafanização com xilol e incluímos os fragmentos em blocos de paraplasti. Realizamos cortes de cinco μm e os coramos com hematoxilina e eosina (HE). Para o estudo histomorfométrico, utilizamos um microscópio óptico comum (CH30, Olympus) com retículo de 100 pontos e 50 retas em área total de $10^4 \mu\text{m}^2$. O aumento final foi de 1000X.^{59,60,61}

3.9.1 QUANTIFICAÇÃO DO ÍNDICE DE EDEMA PERIVASCULAR

Para avaliação do índice de edema perivascular em vias aéreas não cartilaginosas cortadas transversalmente foi utilizado o método morfométrico de contagem de pontos sobre determinada área de $10^4 \mu\text{m}^2$. O edema de região perivascular foi avaliado através da contagem de pontos do retículo que coincidiram com as áreas de edema perivascular dos pulmões.

3.9.2 QUANTIFICAÇÃO DE INFILTRADO LEUCOCITÁRIO EM PARÊNQUIMA PULMONAR E REGIÃO PERIVASCULAR

As quantidades de células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) na região pulmonar (parênquima e região perivascular) foram avaliadas em cortes histológicos de cinco μm utilizando-se um retículo de 100 pontos e 50 retas, área total de $10^4 \mu\text{m}^2$ e aumento final de 1000x (Figura 6). Os resultados foram expressos como a média do número de células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ de área $\pm$ DP.

Avaliamos 20 campos do parênquima pulmonar de cada animal, sendo observados três a cinco ratos de cada grupo. Avaliamos três campos da região perivascular desprezando-se a região entre o bronquíolo e vaso e descontando-se a área correspondente aos espaços alveolares de quatro vasos de cada animal, sendo observados três a cinco ratos de cada grupo.

Figura 6. Fotomicrografia da visualização em microscópio óptico do retículo de pontos e retas (área conhecida de $10.000\mu\text{m}^2$) para realização da quantificação do infiltrado neutrofílico em pulmão e edema perivascular.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada em duas fases distintas, e portanto, não realizamos comparações estatísticas entre os dados da Fase I e Fase II.

Apresentamos os resultados como média dos valores $\pm$ DP.

As comparações estatísticas entre grupos foram realizadas com o Teste de Kruskal Wallis. As diferenças entre os grupos foram testadas com o Teste de Dunn, e as diferenças entre tempos (basal e 2-h) foram testadas com o Teste de Sinais de Wilcoxon. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

Apresentamos os resultados das FASES I e II nas formas descritivas e comparativas em tabelas e figuras. Discriminamos os valores individuais de cada animal em anexos.

O número de animais oscilou na análise de cada variável desse estudo, sendo diferenciados nas tabelas ou figuras.

4.1 FASE I

4.1.1 Peso e pressão arterial média

Os animais desta fase apresentaram média de peso de 234g e os dados individuais do peso de cada animal foram apresentados no ANEXO A.

Tabela 1. Médias, desvios-padrão (DP) de pressão arterial média (PAM) no basal, 30, 60, 90 e 120 minutos de VM

PAM	Basal		30 minutos		60 minutos		90 minutos		120 minutos	
Grupos	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
INTACTO	113	7	121	18	128	20	108	26	107	8
PEEP0	131	17	117	17	115	10	115	16	121	21
PEEP5	117	17	130	16	126	16	123	12	122	20
PEEP10	118	22	127	19	115	14	112	12	118	16

Os dados individuais de PAM de cada animal nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos foram apresentados no ANEXO B.

Observamos que durante período de estudo não houve diferença significativa da pressão arterial média entre os grupos como demonstramos abaixo na Figura 7.

Figura 7. Pressão arterial média (PAM) durante o período de estudo nos grupos INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10.

4.1.2 Dados gasométricos do sangue arterial

Os dados individuais de cada animal da análise gasométrica da amostra de sangue coletada na artéria carótida direita nos tempos basal e 2 horas foram apresentados no ANEXO C.

Após 2 horas de VM observamos um aumento da PaO_2 (>300 mmHg) e uma diminuição da PaCO_2 (37 mmHg, $p < 0,05$) sem variações do pH (7,40).

Tabela 2. Médias, desvios-padrão (DP) das variáveis: pH e gases sanguíneos nos grupos PEEP0, PEEP5 e PEEP10 (*, $p < 0,05$ vs basal)

Grupos	pH		PaCO_2 (mmHg)		PaO_2 (mmHg)	
	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas
PEEP0	$7,34 \pm 0,01$	$7,39 \pm 0,06$	42 ± 8	$36 \pm 2^*$	83 ± 24	$291 \pm 79^*$
PEEP5	$7,36 \pm 0,04$	$7,37 \pm 0,07$	41 ± 3	$37 \pm 3^*$	95 ± 11	$425 \pm 55^*$
PEEP10	$7,35 \pm 0,03$	$7,40 \pm 0,01$	49 ± 3	$40 \pm 0^*$	86 ± 7	$413 \pm 31^*$

4.1.3 Dados de microscopia intravital

Realizamos a técnica de microscopia intravital em vênulas pós-capilares na microcirculação mesentérica de ratos em todos os grupos após 2 horas de VM (Figura 8). Os diâmetros dos vasos foram similares em todos os grupos: INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10 ($13,7 \pm 2,8$, $11,8 \pm 3,0$, $13,8 \pm 1,6$ e $13,8 \pm 2,6$ μm , respectivamente, $p > 0,05$). Os valores individuais do diâmetro venular de cada animal foram apresentados no ANEXO A.

Figura 8. Fotomicrografias representativas de vênulas pós-capilares na microcirculação mesentérica, nas quais (A) INTACTO, (B) PEEP0, (C) PEEP5 e (D) PEEP10

Tabela 3. Médias, desvios-padrão (DP) das variáveis de interações leucócito-endotélio: rollers, leucócitos aderidos e leucócitos migrados após 2 horas de VM nos grupos INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10 ($p < 0,05$).

Grupos	Rollers		Aderidos		Migrados	
	nº de células/10 min		nº de cels/100µm		nº de cels/5.000µm ²	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
INTACTO	118	9	3	1	2	1
PEEP0	127	14	3	1	2	1
PEEP5	147	26	4	2	2	1
PEEP10	188*	15	8*	1	12*	1

Os dados individuais de cada animal da quantificação das interações leucócito-endotélio foram apresentados no ANEXO D.

Após 2 horas de VM, notamos poucos leucócitos aderidos e migrados na microcirculação mesentérica nos animais que mantiveram respiração espontânea em ar ambiente. Não observamos diferenças entre os grupos INTACTO, PEEP0 e PEEP5 no número de rollers, aderidos e migrados. No entanto, observamos no grupo PEEP10 um aumento significativo no número de rollers, aderidos e migrados quando comparado com os demais grupos (Figura 9, 10 e 11, respectivamente).

Figura 9. “Rollers” (número de células/10 minutos) em vênulas pós-capilares no mesentério (média $\pm$ DP) nos grupos INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10 ($\dagger$, $p < 0,05$ vs outros grupos)

Figura 10. Leucócitos aderidos (número de células/100 μ m da vênula) em vênulas pós-capilares no mesentério (média $\pm$ DP) nos grupos INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10 ($\dagger$, $p < 0,05$ vs outros grupos)

Figura 11. Leucócitos migrados (número de células/5,000 μm^2) em vênulas pós-capilares no mesentério (média $\pm$ DP) nos grupos INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10 (†, $p < 0,05$ vs outros grupos)

4.1.4 Dados de análise histomorfométrica

Na análise do parênquima pulmonar não observamos hemorragia intra-alveolar nem presença de membrana hialina em todos os grupos. Entretanto, nos grupos que foram ventilados mecanicamente observamos um acúmulo de neutrófilos no parênquima pulmonar e na região perivascular comparada com o grupo INTACTO (Tabela 4).

Tabela 4. Médias $\pm$ desvios-padrão (DP) das variáveis: infiltração neutrofílica em parênquima pulmonar e infiltração neutrofílica e edema em região perivascular nos grupos INTACTO, PEEP0, PEEP5 e PEEP10 após 2 horas de VM (*, $p < 0.05$ vs INTACTO; †, $p < 0.05$ vs outros grupos).

Grupos	Parênquima	Região Perivascular	
	PMN células/ $10^4 \mu\text{m}^2$	Edema	PMN células/ $10^4 \mu\text{m}^2$
INTACTO	1.22 ± 1.19	0.03 ± 0.02	0.72 ± 0.05
PEEP0	$9.67 \pm 3.78^*$	$0.24 \pm 0.03^*$	$1.90 \pm 0.75^*$
PEEP5	$11.49 \pm 3.36^*$	$0.23 \pm 0.04^*$	0.72 ± 0.47
PEEP10	$9.47 \pm 1.95^*$	$0.54 \pm 0.04^{*\dagger}$	$1.28 \pm 0.17^*$

Além disto, encontramos edema perivascular em todos os grupos sob VM quando comparamos com o grupo INTACTO, sendo que presenciamos no grupo PEEP10 um edema maior quando comparado com os demais grupos (Figura 12).

Figura 12. Fotomicrografias histológicas de pulmões de ratos. Grupos correspondentes (A) INTACTO; (B) PEEP0; (C) PEEP5 e (D) PEEP10. As setas indicam a formação de edema em região perivascular vistas em cortes transversais. Aumento final 100X, HE.

4.2 FASE II

4.2.1 Peso e pressão arterial média

Os animais desta fase apresentaram uma média de peso de aproximadamente 253 ± 27 g. Os dados individuais do peso de cada animal foram apresentados no ANEXO E.

Tabela 5. Médias, desvios-padrão (DP) da variável pressão arterial média antes e durante as 2 horas de VM (*, $p < 0,05$ vs basal).

PAM	Basal		30 minutos		60 minutos		90 minutos		120 minutos	
Grupos	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
LTV	112	17	106	21	101*	10	106	14	109	21
HTV	119	18	121	22	128	21	122	19	107	17
PTX	110	11	111	19	115	20	117	15	111	12

Os dados individuais de cada animal da pressão arterial média nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos foram apresentados no ANEXO F.

Observamos que houve uma diminuição significativa da pressão arterial média apenas nos 60 minutos de VM do grupo LTV comparado ao tempo basal deste mesmo grupo. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos LTV, HTV e PTX nos demais tempos (Figura 13).

Figura 13. Pressão arterial média $\pm$ DP durante o período de estudo nos grupos LTV, HTV e PTX.

4.2.2 Dados do fluxo da artéria mesentérica

Os dados individuais de cada animal da velocidade do fluxo sanguíneo mesentérico após 2 horas de VM foram apresentados no ANEXO G. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,149$).

Tabela 6. Médias, desvios-padrão (DP) da variável: velocidade do fluxo sanguíneo mesentérico após 2 horas de VM nos grupos LTV, HTV e PTX

Grupos	Velocidade do fluxo sanguíneo mesentérico (ml/s)	
	Média	DP
LTV	14	3
HTV	11	2
PTX	12	2

4.2.3 Dados gasométricos do sangue arterial

Os dados individuais de cada animal da análise da amostra de sangue coletada da artéria carótida direita para mensuração da pH e dos gases sanguíneos foram apresentados no ANEXO H.

Não houve diferença significativa dos parâmetros quando avaliados num mesmo intervalo de tempo, porém ao final do período de 2 horas observamos um aumento da PaO_2 nos grupos de LTV e HTV comparado ao tempo basal.

Tabela 7. Médias, desvios-padrão (DP) das variáveis: pH e gases sanguíneos nos grupos LTV, HTV e PTX (*, $p < 0.05$ vs basal; †, $p < 0.05$ vs outros grupos no mesmo período).

Grupos	pH		PaO ₂ (mmHg)		PaCO ₂ (mmHg)	
	Basal	2-horas	Basal	2-horas	Basal	2-horas
LTV	7.33 ± 0,07	7,29 ± 0,06	79 ± 11	118 ± 27*	42 ± 8	49 ± 12
HTV	7,34 ± 0,03	7,31 ± 0,03	91 ± 14	122 ± 20*	45 ± 6	42 ± 10
PTX	7,36 ± 0,02	7,29 ± 0,06	104 ± 13†	104 ± 19†	43 ± 2	50 ± 11

4.2.4 Dados de microscopia intravital

Realizamos a técnica de microscopia intravital em vênulas pós-capilares na microcirculação mesentérica de ratos em todos os grupos após 2 horas de VM (Figura 14) nesta FASE II. Os diâmetros dos vasos foram similares em todos os grupos: LTV, HTV e PTX ($19,4 \pm 2,3$; $21,1 \pm 1,9$ e $20,0 \pm 1,1$ μm , respectivamente). Dados individuais de cada animal dos diâmetros das vênulas foram apresentados no ANEXO E.

Figura 14. Fotomicrografias representativas de vênulas pós-capilares na microcirculação mesentérica, nas quais (A) LTV, (B) HTV e (C) PTX.

Tabela 8. Médias, desvios-padrão (DP) das variáveis de interações leucócito-endotélio: rollers, leucócitos aderidos e leucócitos migrados após 2 horas de VM nos grupos LTV, HTV e PTX (*, $p < 0,05$ vs LTV; †, $p < 0,05$ vs outros grupos).

Grupos	Rollers			Aderidos		Migrados	
	nº de cels/10 min			nº de cels/100µm		nº de cels/5.000µm ²	
	n	Média	DP	Média	DP	Média	DP
LTV	6	136	33	5	2	1	1
HTV	7	206*	29	14†	4	9†	3
PTX	5	179	20	6	4	2	1

Os dados individuais de cada animal da quantificação das interações leucócito-endotélio foram apresentados no ANEXO I.

Após 2 horas de VM, observamos que o grupo LTV apresentou um menor número de rollers quando comparado aos grupos HTV e PTX (Figura 15). Não observamos diferenças significantes nas médias dos valores de leucócitos aderidos e migrados entre os grupos LTV (5 ± 2 células/100 μm e 1 ± 1 células/5.000 μm^2 , respectivamente) e PTX (6 ± 4 células/100 μm e 2 ± 1 células/5.000 μm^2 , respectivamente). No entanto, nós observamos que no grupo HTV houve um aumento no número de leucócitos aderidos (14 ± 4 células/100 μm) e leucócitos migrados (9 ± 3 células/5.000 μm^2) comparado com os grupos LTV e PTX (Figura 16 e Figura 17, respectivamente).

Figura 15. “Rollers” (número de células/10 minutos) em vênulas pós-capilares no mesentério (média $\pm$ DP) nos grupos LTV, HTV e PTX. *, $p < 0.01$ vs LTV

Figura 16. Leucócitos aderidos (número de células/100 μm da vênula) em vênulas pós-capilares no mesentério (média $\pm$ DP) nos grupos LTV, HTV e PTX. [†], $p < 0.01$ vs outros grupos.

Figura 17. Leucócitos migrados (número de células/5,000 μm^2) em vênulas pós-capilares no mesentério (média $\pm$ DP) nos grupos LTV, HTV e PTX. [†], $p < 0.01$ vs outros grupos.

4.2.5 Dados de mecânica respiratória

Os dados individuais de cada animal da pressão traqueal foram apresentados no ANEXO J.

Tabela 9. Médias, desvios-padrão (DP) da variável: pressão traqueal nos tempos basal e 2 horas de VM nos grupos da Fase II (*, $p < 0,05$ vs LTV no mesmo tempo; ¥, $p < 0,05$ vs basal).

Grupos	Pressão traqueal cmH ₂ O	
	Basal	2 horas
LTV	9 ± 2	$11 \pm 2^{\text{¥}}$
HTV	$15 \pm 2^*$	$15 \pm 1^*$
PTX	12 ± 2	$14 \pm 2^{*\text{¥}}$

A pressão traqueal foi maior nos grupos com HTV (HTV e PTX) comparado com o grupo LTV, e a pressão traqueal aumentou ao longo do período de estudo nos grupos LTV e PTX.

Tabela 10. Médias, desvios-padrão (DP) da variável: elastância do sistema respiratório nos tempos basal e 2 horas de VM nos grupos da Fase II (*, $p < 0,05$ vs basal).

Grupos	Elastância cmH ₂ O.ml ⁻¹	
	Basal	2-horas
LTV	4 ± 0	5 ± 2*
HTV	4 ± 1	5 ± 1*
PTX	4 ± 1	5 ± 1*

Os dados individuais de cada animal da elastância do sistema respiratório foram apresentados no ANEXO L. Observamos um aumento da elastância após 2 h de VM comparado ao tempo basal em todos os grupos.

Tabela 11. Médias, desvios-padrão (DP) da variável: resistência do sistema respiratório nos tempos basal e 2 horas de VM nos grupos da Fase II (*, $p < 0,05$ vs basal).

Grupos	Resistência cmH ₂ O.ml ⁻¹ .s	
	Basal	2-horas
LTV	0,20 ± 0,03	0,18 ± 0,03*
HTV	0,20 ± 0,03	0,17 ± 0,02*
PTX	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01*

Os dados individuais de cada animal da resistência do sistema respiratório foram apresentados no ANEXO M. Observamos uma redução da resistência após 2 h de VM comparado ao tempo basal em todos os grupos.

4.2.6 Dados de análise histomorfométrica

Na análise do parênquima pulmonar (Figura 18), não observamos hemorragia intra-alveolar nem presença de membrana hialina em todos os grupos.

Tabela 12. Quantificação de neutrófilos no parênquima pulmonar e na região perivascular e índice de edema em região perivascular (*, $p < 0.05$ vs outros grupos; †, $p < 0.05$ vs LTV).

Grupos	Parênquima Pulmonar	Tecido Perivascular	
	PMN células/ $10^4 \mu\text{m}^2$	Índice de Edema	PMN células/ $10^4 \mu\text{m}^2$
LTV	4 ± 6	$0,44 \pm 0,22$	0 ± 2
HTV	$10 \pm 7^*$	$0,73 \pm 0,18^*$	$3 \pm 5^\dagger$
PTX	5 ± 7	$0,50 \pm 0,20$	2 ± 5

Entretanto, no grupo HTV observamos um aumento significativo da infiltração neutrofílica no parênquima pulmonar e um aumento no edema perivascular em relação ao demais grupos (LTV e PTX).

Figura 18. Fotomicrografias histológicas de pulmões de ratos. Grupos correspondentes (A) LTV; (B) HTV e (C) PTX. As setas indicam a formação de edema em região perivascular vistas em cortes transversais, mais evidente em (B) HTV. Aumento final 100X, HE.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo *in vivo* em ratos com pulmões normais mostrou ser um modelo experimental adequado para avaliar os efeitos da VM e PEEP sobre as interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica. A VM com HTV (10 ml/kg) associada a uma PEEP de zero ou cinco cmH₂O não promoveu alterações significantes na microcirculação mesentérica. Entretanto, a PEEP elevada (10 cmH₂O) associada com HTV (10 ml/kg) induziu alterações microcirculatórias significantes no mesentério que foi evidenciado pelo aumento do número de leucócitos “rollers”, aderidos e migrados para o tecido perivascular, além de evidente inflamação pulmonar. O uso de volume corrente baixo (7 ml/kg) preveniu esses efeitos deletérios da VM sobre a microcirculação mesentérica e pulmões. Além disso, a administração precoce de PTX durante a VM com HTV (10 ml/kg) e PEEP elevada (10 cmH₂O) atenuou a inflamação pulmonar e distúrbios microcirculatórios no mesentério, local distante dos pulmões.

Hipoperfusão do trato gastrointestinal pode ser considerado como um potencial mecanismo para o desenvolvimento de várias complicações incluindo sangramento, sepse e falência de múltiplos órgãos em pacientes grave sob VM.^{13,14,15} A integridade microcirculatória é um dos elementos essenciais para adequada oxigenação tecidual e funcionamento dos órgãos, e pode ter um papel crucial no prognóstico de pacientes graves.^{18,62,63} Os leucócitos circulam na corrente sanguínea e migram para os tecidos em resposta aos sinais da infecção e lesão tecidual.^{64,65,66} As interações leucócito-endotélio são essenciais para uma defesa efetiva da infecção bacteriana, entretanto, uma hiperativação do leucócito e um aumento no

acúmulo de leucócitos no tecido perivascular podem estar associados com uma resposta imune pró-inflamatória exacerbada que pode contribuir para uma lesão microvascular disseminada e subsequente destruição endotelial.²⁸ Em ratos com pulmões intactos, Lim e Wagner⁶⁷ estudaram os efeitos da PEEP de 8 cmH₂O sobre a microcirculação traqueal, mostrando efeitos prejudiciais da distensão de vias aéreas em modelo animal. Neste estudo, as autoras utilizaram a VM com LTV (6 ml/kg), frequência respiratória de 80 rpm e PEEP de 8 cmH₂O e observaram uma diminuição transitória de 30 minutos na pressão arterial média associada ao aumento significativo no número de “rollers” e leucócitos aderidos na microcirculação traqueal, sugerindo que a PEEP de 8 cmH₂O é um nível crítico para a microcirculação traqueal.

Na Fase I do presente estudo, avaliamos as interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica, porque o trato gastrointestinal é um sistema sob risco de disfunção durante a VM com PEEP.^{13,14} Em pacientes graves, a disfunção gastrointestinal tem sido associada com aumento de morbidade e mortalidade^{13,14} Nós mostramos que a combinação de HTV (10 mL/kg) e PEEP elevada (10 cmH₂O) aumenta as interações leucócito-endotélio.²⁹ Nós especulamos que a pressão intratorácica elevada induziu uma compressão gastrointestinal, o que pode ter resultado em hipoperfusão esplâncnica.^{2,15,68,69,70,71,72,73,74} Há relatos na literatura que mostram eventos sequenciais de hipoperfusão/reperfusão causados pelas estratégias ventilatórias associados com hipoperfusão e isquemia mesentérica aguda não oclusiva em ambientes de unidade de terapia

intensiva.⁷⁵ Estudos mostram que alterações de PEEP, altera o FAM na proporção que a PEEP é elevada.⁷⁶ No presente estudo, todos os animais submetidos à VM apresentaram infiltração neutrofílica e edema pulmonar. Nós especulamos fatores como intubação traqueal, hiperóxia e hiperdistensão alveolar durante a VM podem estar associados com essa resposta.^{5,6,7,8,10,77}

Nesta fase I consideramos algumas limitações. Os animais submetidos à VM e PEEP foram ventilados com fração inspirada de oxigênio de 100%, promovendo uma hiperóxia que pode ter induzido inflamação pulmonar. Entretanto, este procedimento foi utilizado para evitar qualquer possibilidade de hipóxia durante a VM. Em ratos, a hipóxia é associada com alterações da permeabilidade de membrana pulmonar e aumento da aderência e migração leucocitária para o tecido perivascular na microcirculação mesentérica.⁷⁸ Na prática clínica, PEEPs elevadas são usadas somente em pacientes com lesão pulmonar aguda, nos quais o aumento da pressão intratorácica causa menores efeitos cardiovasculares.⁷⁹ Entretanto, pacientes com pulmões normais podem necessitar de VM durante a sedação ou anestesia para procedimentos cirúrgicos, em situações de emergência e em unidades de terapia intensiva. Estratégias ventilatórias usando volume corrente alto de 10 ml/kg e níveis de PEEP entre 0 e 10 cmH₂O tem sido usados em pacientes cirúrgicos.^{80,81} A PEEP elevada em indivíduos com pulmões normais sem administração de fluidos reduz o retorno venoso e débito cardíaco. Entretanto, a administração de fluidos ou de agentes inotrópicos são fatores que poderiam interferir nos

resultados microcirculatorios. Além disso, no nosso modelo, a PAM manteve-se estável. As alterações nas interações leucócito-endotélio foram observadas sem alterações na PAM. E finalmente, embora não tenhamos esclarecido os mecanismos envolvidos nesta resposta inflamatória no mesentério, acreditamos que a combinação de fatores como aumento da pressão intratorácica, e ação de forças mecânicas de distensão alveolar e força compressiva sobre os órgãos gastrointestinais podem resultar em hipoperfusão mesentérica e inflamação.

Na Fase II do estudo, avaliamos os efeitos do LTV e PTX sobre a microcirculação mesentérica e inflamação pulmonar de ratos submetidos à VM e comparamos três grupos com o mesmo nível de PEEP elevada (10 cmH₂O), e evitamos a fração inspirada elevada de 100%.

Nesta fase, a VM com 21% de fração inspirada de oxigênio induziu nos ratos com pulmões normais aumento da oxigenação, aumento significativo da pressão traqueal (~15%), diminuição na resistência (~10%), e um significativo aumento na elastância do sistema respiratório (~22%).

O HTV (10 a 14 ml/kg) associado com PEEP elevadas têm sido associados com elevadas taxas de mortalidade (entre 35 a 65%) na síndrome do desconforto respiratório agudo, seguida normalmente de disfunção progressiva de órgãos e sistemas.^{41,82} Dos Santos e colaboradores³⁵ observaram diminuição da complacência pulmonar (~20% a ~40%) em ratos ventilados com HTV (12 ml/kg) comparado com LTV (6 ml/kg) após 2 e 4 horas de VM. No nosso trabalho, o grupo HTV apresentou resultados similares à Fase I de lesão pulmonar associada com um

significante acúmulo de neutrófilos no parênquima, além de edema perivascular. O uso de LTV em ratos com pulmões normais preveniu o acúmulo de neutrófilos e edema no parênquima pulmonar. A redução de volume corrente de 10 ml/kg para 7 ml/kg de peso também preveniu alterações microcirculatórias no mesentério. Observamos menor número de leucócitos “rollers”, aderidos e migrados no LTV comparado com o HTV. Essa resposta microcirculatória deve estar relacionada com a redução de volume corrente que reduziu a pressão traqueal, o que por sua vez pode ter refletido em menor compressão sobre os órgãos gastrointestinais e prevenção de hipoperfusão mesentérica e inflamação.

Além disso, os resultados da Fase II ressaltam que a administração precoce de PTX durante a VM com HTV e PEEP elevada atenua inflamação pulmonar e as interações leucócito-endotélio no mesentério. Previamente, Lessa e colaboradores⁴⁹ demonstraram que a PTX diminui a lesão pulmonar inflamatória em ratos submetidos à VM com HTV (20 ml/kg). Yada-Langui e colaboradores²⁰ também relataram diminuição da resposta inflamatória pulmonar em modelo de choque hemorrágico/reperfusão em ratos Wistar com o uso da PTX e solução salina hipertônica. Os resultados do nosso estudo confirmam esses dados, e mostram o potencial efeito benéfico da PTX sobre os pulmões e microcirculação mesentérica durante a VM com HTV e PEEP elevada. Possivelmente, a PTX atuou sobre os vários estágios da adesão e migração leucocitária,²⁰ exerceu atividades antitrombóticas⁸³ e melhorou a deformabilidade dos eritrócitos.⁴⁶

Devemos considerar, entretanto, algumas limitações da Fase II. A

freqüência respiratória foi diferente no grupo LTV (85 rpm) comparado com os grupos HTV e PTX (70 rpm). Porém, utilizamos essa estratégia para evitar a hipercapnia e acidose, que podem alterar o débito cardíaco e oxigenação da mucosa gástrica.⁸⁴ Nós não quantificamos os mediadores inflamatórios nem moléculas de adesão. Entretanto, mostramos previamente correlações entre expressão de moléculas de adesão (ICAM-1) e interações leucócito-endotélio no pulmão e mesentério após choque hemorrágico/reperfusão e sepse.^{54,57} Além disto, no presente estudo, nós mostramos claramente diferenças significantes nas interações leucócito-endotélio entre os grupos, que não estão associadas com alterações hemodinâmicas como FAM e PAM, os quais se mantiveram inalterados em todos os grupos.

Os nossos resultados mostram alterações significantes da microcirculação mesentérica e inflamação pulmonar com o uso de altas pressões intratorácicas (volume corrente elevado e PEEP elevado), reforçam o uso de LTV durante a VM na proteção pulmonar e na prevenção de distúrbios microcirculatórios em locais distantes do pulmão, mais especificamente no mesentério, e sugerem que o uso da PTX no início da VM pode atenuar a inflamação pulmonar e os distúrbios microcirculatórios no mesentério durante a VM com altas pressões intratorácicas. Futuramente, estes achados podem ajudar na identificação adequada e na promoção de terapias alternativas que previnam o desenvolvimento de complicações gastrointestinais relacionadas à VM.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do nosso presente estudo sugerem que:

- (1) o modelo experimental de ratos Wistar com pulmões normais submetidos à VM e PEEP e sem administração de fluidos é adequado para a observação das interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica;
- (2) a associação de volume corrente elevado (10 ml/kg) e PEEP elevada (10 cmH₂O) durante a VM é prejudicial à microcirculação mesentérica e aos pulmões. A pressão intratorácica elevada aumenta significativamente as interações leucócito-endotélio no mesentério assim como a infiltração neutrofílica em parênquima pulmonar e edema perivascular;
- (3) a PEEP de 10 cmH₂O é um nível crítico para a microcirculação mesentérica de ratos com pulmões normais. Esse nível de PEEP promove aumento de número de leucócitos rollers, aderidos e migrados no mesentério comparados com níveis mais baixos de PEEP (0 e 5 cmH₂O);
- (4) o uso de volume corrente baixo (7 ml/kg) durante a VM é protetor para a microcirculação mesentérica e pulmões. O número de leucócitos “rollers”, aderidos e migrados no mesentério, assim como a infiltração neutrofílica e edema pulmonar com significativamente menor quando comparado com o volume corrente elevado (10 ml/kg);
e
- (5) a administração precoce de PTX no início da VM com volume corrente elevado (10ml/kg) e PEEP elevada (10 cmH₂O) atenua

significativamente a inflamação local (pulmonar) e distante (mesentério) durante a VM com elevada pressão intratorácica. A PTX reduz a infiltração neutrofílica e edema pulmonar, e o número de leucócitos aderidos e migrados no mesentério.

7. ANEXOS

ANEXO A

Dados individuais dos grupos da FASE I: peso e diâmetro de vênula.

INTACTO	Peso (g)	Diâmetro da vênula (μm)
Rato 1	283	19,56
Rato 2	245	22,58
Rato 3	280	16,99
PEEP0	Peso (g)	Diâmetro da vênula (μm)
Rato 1	239	15,97
Rato 2	236	13,32
Rato 3	208	7,89
Rato 4	210	12,44
Rato 5	222	9,00
Rato 6	249	12,25
PEEP5	Peso (g)	Diâmetro da vênula (μm)
Rato 1	191	13,32
Rato 2	234	11,65
Rato 3	261	13,84
Rato 4	273	12,83
Rato 5	303	15,99
Rato 6	225	15,33
PEEP10	Peso (g)	Diâmetro da vênula (μm)
Rato 1	311	17,55
Rato 2	196	16,39
Rato 3	196	12,47
Rato 4	204	10,38
Rato 5	217	13,6
Rato 6	179	11,37
Rato 7	187	14,84

ANEXO B

Dados individuais da pressão arterial média (PAM) dos grupos da FASE I.

INTACTO	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Rato 01	107	109	140	138	100
Rato 02	121	113	105	99	115
Rato 03	110	142	138	88	106
PEEP0	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Rato 1	104	100	110	114	105
Rato 2	138	138	101	93	96
Rato 3	150	115	122	118	136
Rato 4	127	103	114	115	118
Rato 5	135	130	126	137	148
PEEP5	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Rato 1	132	144	145	145	157
Rato 2	111	126	117	118	93
Rato 3	105	145	153	120	113
Rato 4	106	148	115	116	124
Rato 5	105	125	123	127	133
Rato 6	150	120	120	124	122
PEEP10	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Rato 1	106	141	120	111	105
Rato 2	148	135	119	129	133
Rato 3	121	132	127	108	130
Rato 4	98	99	94	100	102

Valores em unidade de mmHg.

ANEXO C

Dados individuais da análise do sangue arterial nos grupos da FASE I nos tempos basal e 2 horas.

Grupos	pH		PaCO ₂ (mmHg)		PaO ₂ (mmHg)	
INTACTO	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas
Rato 1	7,39	---	47,4	---	73,7	---
Rato 2	7,36	---	45,1	---	94,0	---
Rato 3	7,46	---	45,2	---	134,1	---
PEEP0	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas
Rato 1	7,33	7,36	33,2	38,1	108,3	331,1
Rato 2	7,35	7,35	47,5	34,4	81,1	199,3
Rato 3	7,35	7,45	46,6	35,9	59,6	341,1
PEEP5	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas
Rato 1	7,35	7,3	43,6	40,6	100,3	373,1
Rato 2	7,4	7,36	38,2	34	102,5	420,8
Rato 3	7,32	7,44	42,6	37,1	81,8	481,9
PEEP10	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas
Rato 1	7,37	7,41	47,8	40,1	84,9	391,3
Rato 2	7,35	7,41	51,5	39,4	79,6	397,8
Rato 3	7,32	7,39	46,5	39,5	93,9	448,8

ANEXO D

Dados individuais dos grupos da FASE I das interações leucócito-endotélio.

INTACTO	Rollers	Aderidos	Migrados
	nº de cels/10 min	nº de cels/100µm	nº de cels/5.000µm ²
Rato 1	86	3	3
Rato 2	118	4	2
Rato 3	103	2	1

PEEP0	Rollers	Aderidos	Migrados
	nº de cels/10 min	nº de cels/100µm	nº de cels/5.000µm ²
Rato 1	120	3	1
Rato 2	125	3	3
Rato 3	154	2	2
Rato 4	128	2	1
Rato 5	120	3	1
Rato 6	113	2	1

PEEP5	Rollers	Aderidos	Migrados
	nº de cels/10 min	nº de cels/100µm	nº de cels/5.000µm ²
Rato 1	180	7	1
Rato 2	164	5	3
Rato 3	110	3	2
Rato 4	157	3	2
Rato 5	148	4	3
Rato 6	124	4	1

PEEP10	Rollers	Aderidos	Migrados
	nº de cels/10 min	nº de cels/100µm	nº de cels/5.000µm ²
Rato 1	202	9	12
Rato 2	200	8	11
Rato 3	168	8	14
Rato 4	174	9	11
Rato 5	206	8	13
Rato 6	179	7	11
Rato 7	187	9	12

ANEXO E

Dados individuais dos grupos na FASE II: peso e diâmetro de vênula.

LTV	Peso (g)	Diâmetro da vênula (μm)
Rato 1	252	22,62
Rato 2	310	16,66
Rato 3	211	19,20
Rato 4	226	17,25
Rato 5	228	19,05
Rato 6	220	21,37

HTV	Peso (g)	Diâmetro da vênula (μm)
Rato 1	303	23,42
Rato 2	218	19,30
Rato 3	218	19,90
Rato 4	230	21,60
Rato 5	220	24,00
Rato 6	248	19,6
Rato 7	250	20,00

PTX	Peso (g)	Diâmetro da vênula (μm)
Rato 1	250	20,28
Rato 2	250	19,14
Rato 3	260	20,85
Rato 4	240	21,20
Rato 5	245	18,57

ANEXO F

Dados individuais da pressão arterial média (PAM) dos grupos da FASE II.

LTV	0 min	120 min
Rato 1	94	90
Rato 2	94	74
Rato 3	110	129
Rato 4	103	106
Rato 5	135	120
Rato 6	120	119
Rato 7	130	128

HTV	0 min	120 min
Rato 1	118	133
Rato 2	136	81
Rato 3	87	113
Rato 4	116	102
Rato 5	120	112
Rato 6	134	100

PTX	0 min	120 min
Rato 1	118	112
Rato 2	88	100
Rato 3	120	90
Rato 4	105	114
Rato 5	111	115
Rato 6	110	124
Rato 7	120	123

Valores em mmHg.

ANEXO G

Dados individuais dos grupos na FASE II: velocidade do fluxo sanguíneo mesentérico.

LTV	Peso (g)	Velocidade do fluxo sanguíneo mesentérico (ml/s)
Rato 01	252	13,6
Rato 02	310	12
Rato 03	211	18
Rato 04	226	16,6
Rato 05	265	10
Rato 06	285	13,2
Rato 07	290	14
HTV	Peso (g)	Velocidade do fluxo sanguíneo mesentérico (ml/s)
Rato 01	303	9,3
Rato 02	218	8,3
Rato 03	218	13,3
Rato 04	230	14
Rato 05	254	10,8
Rato 06	278	8,5
PTX	Peso (g)	Velocidade do fluxo sanguíneo mesentérico (ml/s)
Rato 01	250	13,2
Rato 02	250	10,5
Rato 03	260	13,8
Rato 04	240	11,5
Rato 05	290	14
Rato 06	295	14
Rato 07	290	9,8

ANEXO H

Dados individuais da análise do sangue arterial nos grupos da FASE II.

Grupos	pH		PaCO ₂ (mmHg)		PaO ₂ (mmHg)	
LTV	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas
Rato 1	7,37	7,23	41,9	59,6	87,7	150,1
Rato 2	7,40	7,27	33,5	46,9	86,0	125,3
Rato 3	7,27	7,27	55,2	54,5	63,6	124,5
Rato 4	7,33	7,30	44,4	50,0	79,3	112,9
Rato 5	7,23	7,39	36,4	26,8	68,5	126,7
Rato 6	7,37	7,25	39,7	56,0	88,3	69,7
HTV	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas
Rato 1	7,35	7,3	47,5	51,3	81,1	134,1
Rato 2	7,3	7,35	49,1	34,1	81,8	118,1
Rato 3	7,35	7,35	42,4	45,1	115,3	149,3
Rato 4	7,38	7,29	42,8	43,5	78,5	91
Rato 5	7,34	7,26	47,6	49,8	81,6	115,2
Rato 6	7,32	7,31	50,4	44,7	90,6	138,7
Rato 7	7,31	7,33	33,7	23,6	105,6	110,5
PTX	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas
Rato 1	7,38	7,25	44,2	58,8	112	105,4
Rato 2	7,361	7,237	43,4	61,7	91,9	130,8
Rato 3	7,34	7,36	43,4	35,8	104,5	106,8
Rato 4	7,38	7,26	39	46,2	120,7	76,8
Rato 5	7,35	7,35	43,4	46	91,6	98,8

ANEXO I

Dados individuais dos grupos da FASE II das interações leucócito-endotélio.

LTV	Rollers	Aderidos	Migrados
	nº de cels/10 min	nº de cels/100µm	nº de cels/5.000µm ²
Rato 1	112	9	2
Rato 2	179	6	1
Rato 3	160	4	2
Rato 4	88	2	1
Rato 5	140	4	1
Rato 6	137	6	1

HTV	Rollers	Aderidos	Migrados
	nº de cels/10 min	nº de cels/100µm	nº de cels/5.000µm ²
Rato 1	182	8	12
Rato 2	234	12	13
Rato 3	244	15	8
Rato 4	192	11	8
Rato 5	168	14	5
Rato 6	230	19	9
Rato 7	195	16	9

PTX	Rollers	Aderidos	Migrados
	nº de cels/10 min	nº de cels/100µm	nº de cels/5.000µm ²
Rato 1	149	3	1
Rato 2	185	2	1
Rato 3	168	10	3
Rato 4	197	10	3
Rato 5	195	5	0

ANEXO J

Dados individuais da análise da pressão traqueal nos grupos da FASE II.

Grupos	Pressão traqueal (cmH ₂ O)	
LTV	Basal	2 horas
Rato 1	10	10
Rato 2	11	11
Rato 3	10	10
Rato 4	8	14
Rato 5	7	10
Rato 6	9	11
HTV	Basal	2 horas
Rato 1	8	11
Rato 2	10	13
Rato 3	10	10
Rato 4	14	14
Rato 5	13	13
Rato 6	13	14
PTX	Basal	2 horas
Rato 1	10	10
Rato 2	11	17
Rato 3	12	12
Rato 4	10	14
Rato 5	13	14
Rato 6	13	15
Rato 7	14	17

ANEXO L

Dados individuais da análise da elastância do sistema respiratório nos grupos da FASE II.

Grupos	Elastância do sistema respiratório (cmH ₂ O.ml ⁻¹)	
	Basal	2 horas
LTV		
Rato 1	3,78	3,76
Rato 2	3,83	4,09
Rato 3	3,57	3,82
Rato 4	4,48	8,06
Rato 5	3,57	5,50
Rato 6	4,70	6,22
HTV		
Rato 1	3,39	3,84
Rato 2	4,27	4,88
Rato 3	3,27	3,51
Rato 4	4,90	5,15
Rato 5	4,46	4,85
Rato 6	4,49	4,99
PTX		
Rato 1	2,88	3,69
Rato 2	5,03	7,87
Rato 3	3,83	3,93
Rato 4	4,10	4,78
Rato 5	4,84	5,35
Rato 6	4,43	5,69
Rato 7	4,77	6,03

ANEXO M

Dados individuais da análise da resistência do sistema respiratório nos grupos da FASE II.

Grupos	Resistência do sistema respiratório (cmH ₂ O.ml ⁻¹ .s)	
	Basal	2 horas
LTV		
Rato 1	0,19	0,17
Rato 2	0,26	0,24
Rato 3	0,19	0,17
Rato 4	0,19	0,15
Rato 5	0,17	0,17
Rato 6	0,18	0,15
HTV		
Rato 1	0,22	0,18
Rato 2	0,23	0,18
Rato 3	0,23	0,19
Rato 4	0,19	0,15
Rato 5	0,15	0,14
Rato 6	0,20	0,15
PTX		
Rato 1	0,19	0,19
Rato 2	0,18	0,17
Rato 3	0,21	0,18
Rato 4	0,18	0,16
Rato 5	0,17	0,16
Rato 6	0,17	0,15
Rato 7	0,19	0,18

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
1. Petty TL. *Perspectiva Histórica da Ventilação Mecânica*. In: Carlson RW, Geheb MA. *Clínicas de Terapia Intensiva*. Editora Interlivros. 1990; 503-520.
 2. Love R, Choe E, Lipton H, Flint L, Steinberg S. Positive End-Expiratory Pressure Decreases Mesenteric Blood Flow despite Normalization of Cardiac Output. *J Trauma*. 1995; 39(2):195-199.
 3. Beyer J, Beckenlechner P, Messmer K. The influence of PEEP ventilation on organ blood flow and peripheral oxygen delivery. *Int Care Med*. 1982; 8:75-80.
 4. Hess DR, Kacmarek RM. Essentials of mechanical ventilation. *In: Physiology effects of mechanical ventilation*. McGraw-Hill Co, Inc. United States of America. 1996; 3-10.
 5. Frank JA, Wray CM, McAuley DF, Schwendener R, Matthay MA. Alveolar macrophages contribute to alveolar barrier dysfunction in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006; 291:L1191-L1198.
 6. Zhang H, Downey GP, Suter P, Slutsky AS, Ranieri VM. Conventional mechanical ventilation is associated with bronchoalveolar lavage-induced activation of polymorphonuclear leukocytes: a possible mechanism to explain the systemic consequences of ventilator-induced lung injury in patients with ARDS. *Anesthesiology*. 2002; 97:1426-1433.

-
7. Held HD, Boettcher S, Hamann L, Uhlig S. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-B and is blocked by steroids. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163:711-716.
 8. Dries DJ, Adams AB, Marini JJ. Time course of physiologic variables in response to ventilator-induced lung injury. *Respir Care.* 2007; 52:31-37.
 9. De Prost N, Roux D, Dreyfuss D, Ricard JD, Le Guludec D, Saumon. Alveolar edema dispersion and alveolar protein permeability during high volume ventilation: effect of positive end-expiratory pressure. *Intensive Care Med.* 2007; (33):711-717.
 10. Miyao N, Suzuki Y, Takeshita K, et al Kudo H, Ishii M, Hiraoka R, et al. Various adhesion molecules impair microvascular leukocyte kinetics in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290:L1059-L1068.
 11. Carvalho, C. R. R. Relatório do Segundo Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica. In: Ventilação Mecânica. Rio de Janeiro: Atheneu. 2000; (8):305-459.
 12. Nakajima Y, Baudry N, Duranteau J, Vicaut E. Microcirculation in intestinal villi: a comparison between hemorrhagic and endotoxin shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164:1526-1530.

-
13. Cook D, Heyland D, Griffith L, Cook R, Marshall J, Pagliarello J, et al. Risk factors for clinically important upper gastrointestinal bleeding in patients requiring mechanical ventilation: Canadian Critical Care Trials Group. *Crit Care Med.* 1999; 27:2812-2817.
 14. Mutlu GM, Mutlu EA, Factor P. GI complications in patients receiving mechanical ventilation. *Chest.* 2001; 119:1222-1241.
 15. Spirt MJ, Guth PH, Randall G, Leung FW. Gastroduodenal perfusion and mortality in mechanical ventilation-dependent patients with systemic inflammatory response syndrome. *Digest Dis Sciences.* 2004; 49:906-913.
 16. Hiratsuka M, Nakagawa NK. Circulação e envelhecimento. In Perracini MR, Fló CM. Funcionalidade e envelhecimento. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Editore Manole, 2009; 1: 307-315.
 17. De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166:98-104.
 18. Trzeciak S, Dellinger P, Parrillo JE, Guglielmi M, Bajaj J, Abate NL, et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med.* 2007; 49:88-98.

19. Childs EW, Wood JG, Smalley DM, Hunter FA, Cheung LY. Leukocyte adherence and sequestration following hemorrhagic shock and total ischemia in rats. *Shock*. 1999; 11:248-252.
20. Yada-Langui MM, Anjos-Valotta EA, Sannomiya P, Rocha e Silva M, Coimbra R. Resuscitation affects microcirculatory polymorphonuclear leukocyte behavior after hemorrhagic shock: role of hypertonic saline and pentoxifylline. *Experimental Biology and Medicine*. 2004; 229:684-693.
21. Pascual JL, Khwaja KA, Ferri LE, Giannias B, Evans DC, Razek T, et al. Hypertonic saline resuscitation attenuates neutrophil lung sequestration and transmigration by diminishing leukocyte-endothelial interactions in a two hit model of hemorrhagic shock and infection. *J Trauma*. 2003; 54:121-132.
22. Pascual JL, Ferri LE, Seely AJE, Campisi G, Chaudhury P, Giannias B, et al. Hypertonic saline resuscitation of hemorrhagic shock diminishes neutrophil rolling and adherence to endothelium and reduces in vivo vascular leakage. *Ann Surg*. 2002; 236:634-642.
23. Xie X, Hedqvist P, Lindbom L. Influence of local haemodynamics on leukocyte rolling and chemoattractant-induced firm adhesion in microvessels of the rat mesentery. *Acta Physiol Scand*. 1999; 165:251-258.

-
24. Steinbauer M, Guba M, Buchner M, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW. Impact of polynitroxylated albumin (PNA) and tempol on ischemia/reperfusion injury: intravital microscopic study in the dorsal skinfold chamber of the Syrian golden hamster. *Shock*. 2000; 14:163-168.
25. Panés J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G, et al. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am J Physiol*. 1995; 269:H1955-H1964.
26. Panés J, Perry MA, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol*. 1999; 126:537-550.
27. Collins T. *Inflamação aguda e crônica*. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patologia estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000; 44-78.
28. Kubes P, Heit B, Van Marle G, Johnston JB, Knight D, Khan A, et al. *In vivo* impairment of neutrophil recruitment during lentivirus infection. *J Immunology*. 2003; 171:4801-4808.
29. Aikawa P, Farsky SHP, Oliveira MA, Pazetti R, Mauad T, Sannomiya P, et al. Effects of different PEEP levels during mechanical ventilation on mesenteric leukocyte-endothelial interactions in rats. (Accept to *Clinics*). 2009.

-
30. Childs ED, Udobi KF, Wood JG, Hunter FA, Smalley DM, Cheung LY. In vivo visualization of reactive oxidants and leukocyte-endothelial adherence following hemorrhagic shock. *Shock*. 2002; 18(5):423-427.
31. Lim LHK, Bochner BS, Wagner EM. Leukocyte recruitment in the airways: an intravital microscopic study of rat tracheal microcirculation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 282:L959-L967.
32. Riaz AA, Wan MX, Schaefer T, Schramm R, Ekberg H, Menger MD, et al. Fundamental and distinct roles of P-selectin and LFA-1 in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the mouse colon. *Ann Surg*. 2002; 236(6):777-784.
33. Nakagawa NK, Nogueira RA, Correia CJ, Shiwa SR, Cruz JWC, Poli de Figueiredo LF, et al. Leukocyte-endothelium interactions after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation/puncture: an intravital microscopic study in rat mesentery. *Shock*. 2006; 26:180-186.
34. Nakagawa NK, Jukemura J, Aikawa P, Nogueira RA, Figueiredo LFP, Rocha e Silva M, et al. In vivo observation of mesenteric leukocyte-endothelial interactions after cecal ligation/puncture and surgical source control. *Clinics*. 2007; 62:321-326.

-
35. Dos Santos CC, Okutani D, Hu P, Han B, Crimi E, He X, et al. Differential gene profiling in acute lung injury identifies injury-specific gene expression. *Crit Care Med.* 2008; 36(3):855-865.
36. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis.* 1974; 110: 556-65.
37. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Res & Crit Care Med.* 1998; 157(1):294-323.
38. Valenza F, Sibilla S, Porro GA, Brambilla A, Tredici S, Nicolini G, et al. An improved in vivo rat model for the study of mechanical ventilatory support effects on organs distal to the lung. *Crit Care Med.* 2000; 28(11): 3697-3704.
39. Amato MBP, Barbas CSV, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GPP, Lorenzi-Filho G, et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 1998; 338:347-54.
40. American Thoracic Society, European Society of Intensive Care Medicine, Société de Réanimation Langue Française. International consensus conferences in intensive care medicine: ventilator-associated lung injury in ARDS. *Intensive Care Med.* 1999; 25(12):1444-1452.

-
41. Antonelli M, Azoulay E, Bonten M, Chastre J, Citerio G, Conti G, et al. Year in review in Intensive Care Medicine, 2008: II. Experimental, acute respiratory failure and ARDS, mechanical ventilation and endotracheal intubation. *Intensive Care Med.* 2009; 35:215-231.
42. American Thoracic Society, European Society of Intensive Care Medicine, Société de Réanimation Langue Française. International consensus conferences in intensive care medicine: ventilator-associated lung injury in ARDS. *Intensive Care Med.* 1999; 25(12):1444-1452.
43. Gajic O, Dara SI, Mendez JL, Adesanya AO, Festic E, Caples SM, et al. Ventilator-associated lung injury in patients without acute lung injury at the onset of mechanical ventilation. *Crit Care Med.* 2004; 32(9):1817-24.
44. Gajic O, Frutos-Vivar F, Esteban A, Hubmayr RD, Anzueto A. Ventilator settings as a risk factor for acute respiratory distress syndrome in mechanically ventilated patients. *Int Care Med.* 2005; 31(7):922-6.
45. Wrigge H, Uhlig U, Baumgarten G, Menzenbach J, Zinserling J, Ernst M, et al. Mechanical ventilation strategies and inflammatory responses to cardiac surgery: a prospective randomized clinical trial. *Intensive Care Med.* 2005; 31(10):1379-87.

-
46. Ohshima N and Sato M. Effect of pentoxifylline on microvascular blood flow velocity. *Angiology*. 1981; 32(11):752-63.
47. Bacher A, Eggensperger E, Koppensteiner R, Mayer N, Klimscha W. Pentoxifylline attenuates the increase in whole blood viscosity after transfusion. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005; 49:41-46.
48. Porter JM, Cutler BS, Lee BY, Reich T, Reichle FA, Scogin JT, et al. Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. *Am Heart J*. 1982; 104:66–72.
49. Lessa A, Suguihara C, Xianyu S, Hehre D, Devia C, Bancalari E. The effect of pentoxifylline on the pulmonary response to high tidal volume ventilation in rats. *Pulm Pharmacol Therapeutics*. 2008; 21:54-60.
50. Lindsey HJ, Kisala JM, Ayala A, Lehman D, Herdon CD, Chaudry IH. Pentoxifylline attenuates oxygen-induced lung injury. *Journal of Surgical Research*. 1994; 56(6):543-8.
51. Pawlik MT, Schreyer AG, Ittner KP, Selig C, Gruber M, Feuerbach S, et al. Early treatment with pentoxifylline reduces lung injury induced by acid aspiration in rats. *Chest*. 2005; 127:613-621.

-
52. Korhonen K, Kiuru A, Svedstrom E, Kaapa P. Pentoxifylline reduces regional inflammatory and ventilatory disturbances in meconium-exposed piglet lungs. *Pediatr Res*. 2004; 56:901-906.
53. Deree J, Lall R, Melbostad H, Loomis W, Hoyt DB, Coimbra R. Pentoxifylline attenuates stored blood-induced inflammation: a new perspective on an old problem. *Surgery*. 2006; 140:186-191.
54. Flynn WJ, Cryer HG, Garrison RN. Pentoxifylline restores intestinal microvascular blood flow during resuscitated hemorrhagic shock. *Surgery*. 1991; 110:350–356.
55. Campos T, Deree J, Martins JO, Loomis WH, Shenvi E, Putnam JG, et al. Pentoxifylline attenuates pulmonary inflammation and neutrophil activation in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2008; 37:42-49.
56. Volman TJ, Goris RJ, Hendriks T. Pentoxifylline does not improve outcome in a murine model for the multiple-organ dysfunction syndrome. *Int Care Med*. 2005; 31(5):701-8.
57. Staudinger T, Prestler E, Graninger W, Locker GP, Knapp S, Laczika K, et al. Influence of pentoxifylline on cytokine levels and inflammatory parameters in septic shock. *Int Care Med*. 1996; 22:888-893.

-
58. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, et al. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergirc airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 35:457-465.
59. Garcia MLB, Paiva PSO, Dolhnikoff M, Jancar S, Saldiva PHN, Martins MA. Airway and pulmonary tissue responses to Platelet-Activating Factor in rats. *Exp Lung Res*. 1994; 20:169-184.
60. Sakae RS, Leme AS, Dolhnikoff M, Pereira PM, Warth MPTN, Zin WA, et al. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacoline in Wistar rats. *Am J Physiol*. 1995; 268(12):L23-L29.
61. Warth MPTN, Maldonado EAL, Fernezlian SM, Leme AS, Perini A, Saldiva PHN, et al. Neurokinin depletion attenuates pulmonary changes induced by antigen challenge in sensitized guinea pigs. *Am J Physiol*. 1995; 268:L781-L788.
62. De Backer D, Creteur J, Dubois MJ, Sakr Y, Vincent JL. Microvascular alterations in patients with acute severe heart failure and cardiogenic shock. *Am Heart J*. 2004; 147:91-99.

-
63. Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 2004; 32:1825-1831.
64. Kishimoto TK, Rothlein R: Integrins, ICAMs, and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites. *Adv Pharmacol.* 1994; 25:117-169.
65. Madorin WS, Martin CM, Sibbald WJ: Dopexamine attenuates flow motion in ileal mucosal arterioles in normotensive sepsis. *Crit Care Med.* 1999; 27:394-400.
66. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH: Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980; 29:189-201.
67. Lim LHK, Wagner EM. Airway distension promotes leukocyte recruitment in rat tracheal circulation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168:1068-1074.
68. Malbrain ML, Chiumello D, Pelosi P, Bihari D, Innes R, Ranieri VM, et al. Incidence and prognosis of intraabdominal hypertension in a mixed population of critically ill patients. a multiple-center epidemiological study. *Crit Care Med.* 2005; 33:315-22.

-
69. Diebel LN, Dulchavsky AS, Wilson RF. Effect of increased intraabdominal pressure on mesenteric and intestinal mucosal blood flow. *J Trauma*. 1992; 33:45-9.
70. Caldwell CB, Ricotta JJ. Changes in visceral blood flow with elevated intraabdominal pressure. *J Surg Res*. 1987;43:14-20.
71. Brienza N, Revelly JP, Ayuse T, Robotham JL. Effects of PEEP on liver arterial and venous blood flow. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:504-10.
72. Fournell A, Scheeren TWL, Schwarte LA. PEEP decreases oxygenation of the intestinal mucosa despite normalization of cardiac output. *Adv Exp Med Biol*. 1998;454:435-40.
73. Schwarte LA, Scheeren TW, Lorenz C, De Bruyne F, Fournell A. Moderate increase in intraabdominal pressure attenuates gastric mucosal oxygen saturation in patients undergoing laparoscopy. *Anesthesiology*. 2004;100:1081-7.
74. Fournell A, Schwarte LA, Kindgen-Milles D, Müller E, Scheeren TW. Assessment of microvascular oxygen saturation in gastric mucosa in volunteers breathing continuous positive airway pressure. *Crit Care Med*. 2003;31:1705-10.

-
75. Bassiouny HS. Nonocclusive mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am.* 1997; 77:319-326.
76. Lehtipalo S, Biber B, Frojse R, et al (2001). Effects of PEEP on intestinal circulation during graded mesenteric artery occlusion. *Acta Anaesthesiol Scand* 45:875-884.
77. Nishio K, Suzuki Y, Aoki T, Suzuki K, Miyata A, Sato N, et al. Differential contribution of various adhesion molecules to leukocyte kinetics in pulmonary microvessels of hyperoxia-exposed rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:599-609.
78. Wood JG, Johnson JS, Mattioli LF, Gonzalez NC. Systemic hypoxia increases leukocyte emigration and vascular permeability in conscious rats. *J Appl Physiol*, 2000; 89:1561-1568.
79. Boker A, Haberman CJ, Girling L, Guzman RP, Louridas G, Tanner JR, et al. Variable ventilation improves perioperative lung function in patients undergoing abdominal aortic aneurysmectomy. *Anesthesiology.* 2004;100:608-16.
80. Aneman A, Pontén J, Fändriks L, Eisenhofer G, Friberg P, Biber B. Hemodynamic, sympathetic and angiotensin II responses to PEEP ventilation before and during administration of isoflurane. *Act Anaesthesiol*

Scand, 1997; 41:41-48.

81. Krenn CG, Krafft P, Schaefer B, Pokorny H, Schneider B, Pinsky MR, et al. Effects of positive end-expiratory pressure on hemodynamics and indocyanine green kinetics in patients after orthotopic liver transplantation. *Crit Care Med*. 2000;28:1760-5.

82. Zhang H, Downey GP, Suter P, Slutsky AS, Ranieri VM. Conventional mechanical ventilation is associated with bronchoalveolar lavage-induced activation of polymorphonuclear leukocytes: a possible mechanism to explain the systemic consequences of ventilator-induced lung injury in patients with ARDS. *Anesthesiology*. 2002; 97:1426-1433.

83. Schroer RH. Antithrombotic potential of pentoxifylline. A hemorheologically active drug. *Angiology*. 1985; 36:387-398.

84. Schwartges I, Schwarte L, Fournell A, Scheeren TWL, Picker O. Hypercapnia induces a concentration-dependent increase in gastric mucosal oxygenation in dogs. *Intensive Care Med*. 2008; 34: 1898-1906.