Alexandre Luque

**Efeitos da estratégia da ventilação mecânica na
função renal de ratos normais**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro

São Paulo

2008

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa Básica,
LIM 12
Disciplina de Nefrologia
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo, SP
Colaboração: Fundação Faculdade de Medicina e LIM-HC-
FMUSP

Dedicatória

Ao amor da minha vida, minha
esposa Mariana, e a minha princesa
Julia.

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro, que confiou em minha capacidade, além de um clínico fantástico, um pesquisador e um professor que faz da pesquisa e do ensino um exemplo de resultado com ética e competência.

A Prof. Dr. Maria Heloisa Massola Shimizu (Helô), a força motriz e espiritual do laboratório. Muito Obrigado por tudo, sem a sua participação a realização deste trabalho não seria viável.

Aos meus pais e ao meu irmão que formam o meu pilar de sustentação como pessoa, amo vocês.

Agradecimentos

À Ciça, pelo cuidado e atenção que dedica aos nossos animais e o carinho que tem comigo.

Ao Nivaldo e a Eloá que garantem a nossa tranquilidade.

À Dr^a. Lúcia Andrade e a Talita Sanches pela disponibilidade e atenção.

"Quem não sabe o que
procura, não entende o
que encontra"

Hans Selye

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

Referências: adaptado de *Internacional Committe of Medical journals Editors* (Vancouver).

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

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

Sumário

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1. Ventilação mecânica (VM) e lesão pulmonar induzida pela VM (VILI).....	2
1.2. Estratégia ventilatória adotada e suas influências em um pulmão sadio	3
1.3. VM e o Rim.....	4
2. Objetivos.....	8
3. Casuística e Métodos	10
3.1. Animais.....	11
3.2. Modelo Experimental.....	11
3.3. Sacrifício dos animais	12
3.4. Grupos de animais estudados.....	13
3.5. Clearance de inulina:.....	13
3.5.1 Dosagem e cálculo do clearance de inulina	14
3.5.2. Potássio urinário e sódio urinário	15
3.5.3. Medida da pressão arterial durante o experimento	15
3.5.4. Dosagem das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (<i>TBARS</i>)	15
3.5.5. Dosagem do eNOS	16
3.6. Análise estatística dos resultados	16
4. Resultados.....	17
4.1. Grupos de animais ventilados com volume corrente de 8ml/kg (V_{T8}) e de 27ml/kg (V_{T27})	18
4.1.1. Peso corpóreo (g).....	18
4.1.2. Mortalidade (%)	18
4.1.3. Parâmetros ventilatórios.....	18
4.1.4. Pressão arterial (mmHg)	20
4.1.5. Valores gasométricos e lactato (mmol/L)	20
4.1.6. Hemoglobina (g/dl) e Hematócrito (%)	20
4.1.7. Clearance de inulina (ml/min/100gPC).....	25
4.1.8. Volume urinário	25
4.1.9. FEH_2O (%), $FENa$ (%) e FEK (%)	25
4.1.10. Ácido tiobarbitúrico - <i>TBARS</i> (nanomoles/ml)	25
4.1.11. eNOS.....	25
5. Conclusões.....	32
6. Discussão	34
7. Referências.....	42

ANEXOS

RESUMO

LUQUE, A. Efeitos da estratégia da ventilação mecânica na função renal de ratos normais –. São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A ventilação mecânica (VM) tem sido recentemente associada ao desenvolvimento de falências orgânicas distais, como um fator contribuinte para a falência renal em pacientes com trauma e fator de risco para diálise e mortalidade em unidade de terapia intensiva (UTI). A estratégia ventilatória adotada pode influenciar estes efeitos. O objetivo do presente estudo é explorar a hipótese de que a estratégia de ventilação mecânica adotada pode influenciar na função renal.

Delineamento: Randomizado, investigação animal experimental.

Casuística: Ratos machos Wistar, anestesiados, paralisados e ventilados mecanicamente.

Intervenção: Dois grupos com seis animais cada foram randomizados para receberem ventilação mecânica com volume corrente (V_T) de 8ml/kg (V_{T8}) ou 27ml/kg (V_{T27}). Os parâmetros ajustados para grupo foram: a) V_T 8ml/kg; Frequência respiratória (FR) 60 ± 7 rpm; pressão positiva expiratória final (PEEP) 3 cmH₂O; Pico de pressão inspiratória (P_{wa_p}) 11.8 ± 2 cmH₂O; Pressão média de vias aéreas (P_{aw_m}) $6,33 \pm 0,22$ e b) V_T 27ml/kg; FR 30 ± 5 rpm; PEEP 0 cmH₂O; P_{wa_p} 22.7 ± 4 cmH₂O; P_{aw_m} $6,50 \pm 0,22$.

Mensurações e Resultados: O grupo V_{T27} apresentou redução significativa no clearance de inulina após 60 minutos de VM, indicando insuficiência renal aguda (0.6 ± 0.05 ml/min/100g de peso corporal (PC)), e ainda mais acentuada após 90 minutos de VM (0.45 ± 0.05 ml/min/100g de PC) comparada aos valores basais (0.95 ± 0.07 ml/min/100g de PC), $p < 0.001$. Nenhum dos dois grupos sofreram variações significativas em relação as variáveis hemodinâmicas e gasométricas.

Conclusões: Observamos que o ritmo de filtração glomerular (RFG) mensurado pelo clearance de inulina é afetado pela estratégia de volume corrente empregado após 60 minutos de VM com 27ml/kg e caindo a valores mais baixo após 90 minutos de VM.

Descritores: 1.Ratos Wistar 2.Respiração artificial 3.Insuficiência renal aguda
4.Taxa de filtração glomerular 5.Respiradores mecânicos 6.Inulina.

SUMMARY

LUQUE; A. – **Effects of mechanical ventilation strategy on renal function in normal rat model**. São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Mechanical Ventilation (MV) has been recently associated with development of distal organ failure and it is also a contributor factor for renal failure in trauma patients, and risk factor for dialysis and mortality rate in intensive care unit. The ventilatory strategy adopted might be influenced this effect. The aim of the present study was to explore the hypothesis that mechanical ventilatory strategy may contribute to decreased renal function.

Design: Randomized animal laboratory investigation.

Subjects: Anesthetized, paralyzed, and mechanically ventilated male Wistar rats.

Interventions: Two groups of six rats each were randomized to receive tidal volume of either 8ml/kg or 27 ml/kg. Ventilation strategies for the two groups were as follows: a) 8ml/kg; frequency 60 ± 7 beats/min; positive end-expiratory pressure, 3.0 cm H₂O; and peak inspiratory airway pressure (Paw_p), 11.8 ± 2 cm H₂O; and b) 27ml/kg; frequency 30 ± 5 beats/min; positive end-expiratory pressure, 0 cm H₂O; and peak inspiratory airway pressure (Paw_p), 22.7 ± 4 cm H₂O; Both groups with the same mean airway pressure (Paw_m), 6.33 ± 0.21 and 6.5 ± 0.22 , respectively.

Measurements and main Results: Rats ventilated with high tidal volume (27ml/kg) presented significantly decreased inulin clearance after 60 minutes of mechanical ventilation, indicating acute renal insufficiency (0.6 ± 0.05 ml/min/BW) in comparison with basal values (0.95 ± 0.07 ml/min/BW), $p < 0.001$. We observed decreased inulin clearance in rats that received high tidal volume, after 60 minutes of ventilation and even more significant at 90 minutes of ventilation (0.45 ± 0.05 ml/min/BW) compared with basal values. No inulin clearance alteration was observed in

control ventilation group (0.8 ± 0.05 ml/min/BW basal vs. 0.72 ± 0.03 ml/min/BW 120 min of MV).

Conclusion: We concluded that GFR is affected by different strategies of mechanical ventilation, and after 60 minutes of high tidal volume (27ml/kg) ventilation the renal function markedly decreased, getting worse after 90 minutes.

Descriptors: 1.Wistar rats 2.Artificial respiration 3.Acute renal failure 4.Glomerular filtration rate 5.Mechanical ventilation 6.Inulin.

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Ventilação mecânica (VM) e lesão pulmonar induzida pela VM (VILI).

A ventilação mecânica é um coadjuvante indispensável no tratamento de pacientes críticos, restabelecendo as trocas gasosas e promovendo descanso e recuperação da musculatura respiratória em muitos estados patológicos. Em algumas doenças específicas como na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), os ajustes ventilatórios se tornam preocupantes e podem interferir na taxa de mortalidade destes pacientes¹⁻⁴.

Esta potencial relação entre a ventilação mecânica e a taxa de mortalidade em pacientes com SDRA ressalta os efeitos adversos que a ventilação mecânica pode produzir. Estudos iniciais e experimentais sobre o início e o curso da lesão pulmonar induzida pela ventilação direcionaram os fatores de contribuição como sendo os níveis de pressão e volume adotados⁵⁻⁷. Após estes resultados, estratégias protetoras limitando os níveis de pressão e de volume e manutenção do recrutamento de unidades alveolares instáveis têm sido propostas para evitar ou amenizar a VILI⁸⁻¹⁰.

Os mecanismos envolvidos na VILI são: a lesão provocada pela hiperdistensão (volutrauma), a lesão decorrente da abertura e fechamento (atelectotrauma ou lesão cíclica) teoricamente evitada pelo uso de pressão positiva no final da expiração (PEEP)^{10;11}, a lesão provocada por altas pressões (barotrauma), a lesão pela toxicidade do oxigênio e a inflamação

pulmonar e sistêmica originada por mediadores inflamatórios liberados em uma ventilação lesiva (biotrauma)^{12;13}.

Embora os mecanismos pelos quais a ventilação mecânica pode iniciar ou acentuar a VILI serem em parte conhecidos, e pesquisas avaliando estratégias protetoras tem demonstrado efeitos benéficos em estudos experimentais, a mortalidade de pacientes com SDRA ainda se mantém alta (35%-65%)^{1;2;14;15}, e em grande parte por disfunções multi-orgânicas^{16;17}.

1.2. Estratégia ventilatória adotada e suas influências em um pulmão sadio.

Webb and Tierney¹⁸ foram os primeiros autores a mostrarem que a ventilação mecânica pode provocar edema pulmonar em animais intactos. Eles foram capazes de demonstrar em ratos submetidos à ventilação mecânica com pressão positiva que o edema pulmonar foi mais severo e mais rápido em animais ventilados com pressão de pico de vias aéreas (Paw_p) de 45 cmH₂O comparada a Paw_p de 30 cmH₂O. Os animais ventilados com Paw_p de 14 cmH₂O por 1 hora não desenvolveram edema pulmonar.

Estudos seqüentes demonstraram que a VILI depende principalmente do volume pulmonar empregado e especialmente em relação ao volume inspiratório final¹⁹. As relações do aumento da pressão inspiratória e do volume corrente com a fisiopatologia da VILI foram melhor esclarecidas demonstrando que a VM em ratos intactos com volume corrente (V_T) elevado ou baixo, mas, com a mesma pressão de pico (45

cmH₂O) resultou em diferentes efeitos pulmonares. Apenas os animais ventilados com elevado V_T apresentaram alterações estruturais e edema pulmonar¹⁹.

Consequentemente o termo “volutrauma” foi sugerido como mais apropriado do que barotrauma nesta situação específica^{20;21}. Outros investigadores encontraram as mesmas conclusões em diferentes protocolos e modelos²²⁻²⁴. Considerando todos estes estudos em conjunto, os experimentos demonstraram que o volume corrente elevado comparado à elevação da pressão intra-torácica por si resulta em edema pulmonar induzido pela ventilação em animais intactos.

No entanto, o que significa volume corrente elevado em ratos saudáveis? Usualmente volumes corrente superiores a 20 ml/kg são considerados elevados, porém, um recente estudo que explorou qual o valor de volume corrente e o tempo de aplicação destes volumes passam a promover efeitos lesivos em pulmão de ratos sadios demonstrou que somente volumes correntes superiores a 27ml/kg e por mais de 3 horas se demonstraram lesivos²⁵.

1.3. VM e o Rim.

Uma das manifestações de falência orgânica mais precoce nas unidades de terapia intensiva (UTI) é a falência renal aguda^{26;27}, com uma prevalência variando entre 4% e 16%, associado com aumento da taxa de mortalidade^{28;29}. Um destes estudos avaliou prospectivamente 256 pacientes com necrose tubular aguda e encontrou que a ventilação mecânica é um

fator preditivo da necessidade de diálise, bem como da taxa de mortalidade²⁹.

A ventilação mecânica parece ser um forte preditor de mortalidade em pacientes com falência renal aguda na UTI. A incidência de disfunção renal parece ser modificada com a estratégia ventilatória adotada, Ranieri et al.³⁰, em 2000 observaram uma alta incidência de falência renal em pacientes que foram ventilados utilizando estratégias convencionais comparado à aqueles que receberam estratégia ventilatória protetora (baixos volumes corrente e PEEP elevados), embora em análise retrospectiva.

Um número variado de fatores biológicos e fisiológicos pode associar a ventilação mecânica à falência renal aguda. Um dos mecanismos mais relacionados à falência renal na UTI é a necrose tubular aguda, que pode ser de origem tóxica ou isquêmica³¹, a disfunção renal aguda induzida pela necrose tubular aguda é geralmente dependente de ambas as origens³².

A ventilação mecânica pode induzir a falência renal aguda por três mecanismos propostos: a) através dos efeitos nos gases arteriais; b) através do efeito sobre o fluxo sanguíneo sistêmico e renal; c) através da liberação sistêmica de agentes inflamatórios (biotrauma)^{32;33}. Os efeitos renais da hipoxemia isolada ou associada à hipercapnia e os efeitos do aumento da pressão intratorácica tem sido descritos na literatura há anos^{32;34-38}, embora ainda controversos estabeleçam importantes informações sobre os efeitos da ventilação mecânica na função renal.

Recente atenção tem sido voltada ao efeito do biotrauma pulmonar e liberação de agentes inflamatórios na circulação sistêmica sobre a disfunção de outros órgãos, dentre eles, o rim. Duas hipóteses sobre estas relações são discutidas, a de que a ventilação pode provocar liberação de mediadores inflamatórios na circulação sistêmica e a de que estes mediadores tenham ações biológicas¹³.

Existem apenas algumas pesquisas que direcionaram o biotrauma à disfunção renal, Gurkan et al.³⁹ analisaram o efeito de diferentes estratégias ventilatórias (lesivas e não-lesivas) em um modelo de inflamação pulmonar induzida por administração de ácido clorídrico em ratos e observou no pulmão, rim e fígado níveis elevados de interleucina (IL-6) após ventilação mecânica com altos volumes correntes (17ml/Kg). Entretanto, a função renal não foi estudada.

Imai et al.⁴⁰ avaliando a hipótese de que a estratégia ventilatória lesiva (17ml/Kg) pode induzir apoptose celular e disfunção orgânica, em um modelo de lesão com ácido clorídrico em coelhos, encontrou que a ventilação mecânica lesiva induziu apoptose de células epiteliais no rim e no intestino acompanhados de evidências bioquímicas de disfunção orgânica. A função renal só foi observada pelas mensurações de uréia e creatinina, não foi realizada uma avaliação mais concisa da função renal.

As implicações negativas da ventilação mecânica na função renal podem ser originadas de várias formas, embora estudada há algum tempo, a carência de informações sobre os efeitos isolados da estratégia de ventilação mecânica adotada na função renal mensurada adequadamente,

justifica pesquisas na área de interesse, buscando aprimorar a fisiopatologia da lesão à distância provocada pela ventilação mecânica.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a função renal de ratos saudáveis submetidos a diferentes estratégias de volume corrente empregado.
- Avaliar a possível participação do stress oxidativo e da expressão de óxido nítrico sintetase (eNOS) na fisiopatologia da lesão orgânica à distância provocada pela VM.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados 15 ratos machos Wistar, cedidos pela Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP, pesando entre 240 e 435g, ventilados mecanicamente com 8ml/kg ou 27ml/kg por 120 minutos. Este protocolo de pesquisa foi aprovado pela CAPPesq pelo parecer nº963/05.

3.2. Modelo Experimental

Uma série de estudos pilotos foi realizado para estabelecer as estratégias de ventilação mecânica empregadas caracterizando diferentes volumes corrente, mas com a mesma pressão média de vias aéreas, pressão arterial média, oxigenação e equilíbrio ácido-base. Foram realizados testes com vários valores de volume corrente e consideramos como volume corrente elevado o valor de 27ml/kg baseado em resultados recentes do valor do volume corrente empregado e o tempo de aplicação para induzir lesão pulmonar induzida pelo ventilador em ratos saudáveis que consideraram a necessidade de valores superiores a 27ml/kg e por mais de três horas para induzir lesão pulmonar.

O outro grupo de animais foi ventilado com 8ml/kg, sendo um valor consagrado como um ajuste de volume corrente fisiológico para animais e seres humanos. Após estes modelos pilotos foi possível constatar que diferentes estratégias de volume corrente poderiam manter a mesma

Paw_m , Pam , oxigenação e equilíbrio ácido-base. Para isso diferentes frequências respiratórias foram ajustadas entre os grupos, além da adição de 3 cmH₂O de PEEP no grupo ventilado com 8ml/kg.

3.3. Sacrifício dos animais

Após a finalização dos experimentos propostos, os animais foram sacrificados pela injeção endovenosa de excesso de anestésico, pentobarbital sódico.

3.4. Grupos de animais estudados

Foram estudados dois grupos de animais, divididos entre ventilados mecanicamente com 8ml/kg (n=6) ou 27ml/kg (n=6).

3.5. Clearance de inulina:

O estudo de clearance de inulina foi desenvolvido sob anestesia com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/Kg de peso, via intraperitoneal. Para manutenção de boa ventilação, os animais foram intubados pela cateterização da traquéia com tubo de polietileno PE-240. A seguir, foram cateterizadas as veias jugulares, com PE-60, uma delas para infusão da solução de inulina a 10%, primeiramente como dose inicial (100 mg/Kg) para elevar a concentração desta substância no sangue e, a seguir, foi mantida infusão da mesma solução durante todo o experimento, através de bomba de infusão "Harvard", numa velocidade constante de 0.04 ml/min. A outra veia jugular cateterizada foi utilizada para controle da anestesia e posterior sacrifício dos animais. A artéria carótida também foi cateterizada com PE-60 para coleta das amostras de sangue, em diferentes intervalos e, também, para controle da pressão arterial monitorada através de manômetro de mercúrio. A bexiga urinária foi cateterizada com PE-240, para coleta de urina. No final do experimento, o rim esquerdo foi perfundido *in situ* com pressão controlada, lavados com solução salina e fixados em Duboscq-Brasil. Após esta fixação foram cortados em quatro secções e colocados em solução tamponada a 10% de formaldeído. O rim direito foi seccionado em três partes e congelado a -70°C para posterior análise.

3.5.1. Dosagem e cálculo do clearance de inulina

Para a dosagem da inulina urinária e plasmática utilizamos o método colorimétrico da Antrona, com leitura em espectrofotômetro CELM, comprimento de onda 620 nm⁴¹.

$$C_{in} = (U_{in} \times V_u) / P_{in}, \text{ onde:}$$

U_{in} = (concentração urinária de inulina em mg/dl)

P_{in} = (concentração plasmática de inulina em mg/dl)

V_u = (volume urinário em ml/min)

O “clearance” de inulina foi expresso corrigindo-se por 100 g de peso corpóreo, ou seja:

$$C_{in} = \text{ml/min} / 100\text{g de peso corpóreo}$$

3.5.2. Potássio urinário e Sódio urinário

A dosagem de potássio e sódio urinário e plasmático foram realizadas em Fotômetro de Chama, marca Celm.

3.5.3. Medida da pressão arterial durante o experimento

Foram efetuadas medidas da pressão arterial (mmHg) no dia do experimento de clearance, através de cateterização da artéria carótida, com PE-60 e monitorada por manômetro de mercúrio.

3.5.4. Dosagem das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As concentrações urinárias de *TBARS* foram determinadas utilizando-se o método colorimétrico do ácido tiobarbitúrico. Uma amostra de urina foi diluída em água destilada. Imediatamente, adicionou-se 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 17.5%. Em seguida foi adicionado 1 ml de ácido tiobarbitúrico a 0,6%, pH 2. As amostras foram colocadas em banho de água fervente por 15 minutos e a seguir resfriadas, sendo depois, adicionado a esta mistura 1 ml de TCA a 70% e incubada por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2000 RPM e a densidade óptica do sobrenadante lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 543 nm contra reagente branco. A concentração dos produtos da peroxidação lipídica foi calculada, utilizando-se coeficiente de extinção molar equivalente para malondialdeído (MDA-equivalente), de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$

$^1 \text{ cm}^{-1}$ (utilizado para o complexo malondialdeído e ácido tiobarbitúrico) Os níveis de *TBARS* urinário foram expressos em nanomoles/24h⁴²⁻⁴⁶.

3.5.5. Dosagem do eNOS

Amostras do rim foram homogeneizadas em solução isolante com gelo (200mM manitol, 80 mM HEPES, 41 MM KOH-pH 7,5) contendo inibidores de protease (cocktail de inibidor de protease, Sigma) utilizando uma lâmina de teflon para homogeneização (Schmidt and Co). A amostra homogeneizada foi centrifugada em baixa velocidade (3000 x g) por 15 minutos a 4°C para a remoção do núcleo e detritos celulares. As “pellets” foram suspensas em solução isolante com inibidor de protease. O total de proteínas foi determinado pelo método de Bradford.

Para a avaliação da isoforma do eNOS, 100µg de proteína total de cada amostra foi separado em gel poliacrilamida (8%) e transferida para uma membrana PVDF. Immunoblotting foi realizado com anticorpo para e NOS diluído 1:2000 em solução salina tampão e Tween 0,1%.

3.6. Análise estatística dos resultados

Os dados foram analisados utilizando-se análise de variância – ANOVA e pós-teste Student-Newman-Keuls, pelos programas de estatística, GraphPad Prisma (versão 3.0). Para avaliação da imunohistoquímica utilizamos teste *t* não pareado com correção Welch. O teste-t foi utilizado quando apropriado.

Os resultados foram apresentados com média $\pm$ erro padrão, sendo considerados significantes as diferenças quando, $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Grupos de animais ventilados com volume corrente de 8ml/kg (V_{T8}) e de 27ml/kg (V_{T27}):

4.1.1. Peso corpóreo (g)

Não houve diferença de peso corpóreo entre os animais do grupo V_{T8} e V_{T27} mensurado imediatamente antes do início do experimento, $V_{T8} = 326 \pm 61$; $V_{T27} = 340 \pm 40$, (NS), como demonstrado na TABELA 1.

4.1.2. Mortalidade (%)

Do total de 15 animais submetidos aos procedimentos, A TABELA 1 mostra a taxa de mortalidade observada entre os animais, $V_{T8} = 14,28\%$ ($n = 1$, após 90 minutos de ventilação mecânica); $V_{T27} = 25\%$ ($n = 2$, após 60 minutos de ventilação mecânica), 6 animais por grupo complementaram todo o protocolo como planejado. Não foi realizada análise estatística da taxa de mortalidade.

4.1.3. Parâmetros ventilatórios

Observamos na TABELA 1 as estratégias de ventilação mecânica aplicadas nos grupos V_{T8} e V_{T27} . A frequência respiratória (FR) ajustada foi menor no grupo V_{T27} em relação ao grupo V_{T8} ($p < 0,0001$). O pico de pressão das vias aéreas (Paw_p) foi maior no grupo V_{T27} comparado ao do grupo V_{T8} ($p < 0,0001$). A pressão média de vias aéreas (Paw_m) não foi diferente entre os grupos.

TABELA 1. Resultados do peso corpóreo, taxa de mortalidade e parâmetros ventilatórios dos grupos V_T8 e V_T27.

Grupos	PC (g)	Mortalidade (%)	Fr (rpm)	Paw_p (cmH₂O)	Paw_m (cmH₂O)
V_T8 (n=6)	326 ± 61	14.28	61.5 ± 0.22	11.8 ± 2	6.33 ± 0.21
V_T27 (n=6)	340 ± 40	25 ^a	33.6 ± 1.56 ^b	22.7 ± 4	6.50 ± 0.22

Os resultados estão expressos em média ± EP

^a $p < 0,01$, ^b $p < 0,0001$; comparação entre grupos V_T8 e V_T27

Teste-*t* não pareado

4.1.4 Pressão arterial (mmHg)

A TABELA 2 mostra os resultados da pressão arterial nos grupos V_{T8} e V_{T27} ao longo de todo o experimento. Os valores não foram diferentes entre os grupos durante todo o curso do experimento, FIGURA 1. Os valores de lactato não foram diferentes entre os grupos V_{T8} e V_{T27} e ao longo do curso do experimento, TABELA 3.

4.1.5 Valores Gasométricos e Lactato (mmol/L)

Na TABELA 3 observamos aumento da PaO_2 (mmHg) em ambos os grupos (V_{T8} e V_{T27}) após 30 minutos de VM em comparação aos valores basais ($p < 0,001$). Estes valores permaneceram elevados após 120 minutos de VM em relação aos valores basais ($p < 0,001$). Não observamos diferenças entre os grupos durante todo o curso do experimento.

4.1.6 Hemoglobina (g/dl) e Hematócrito (%)

Não foi observada diferença entre os valores de Hb e Ht durante o curso do experimento e entre os grupos V_{T8} e V_{T27} como demonstrado na TABELA 3.

Tabela 2. Resultados dos valores de pressão arterial média ao longo do tempo, dos grupos V_T8 e V_T27.

GRUPOS	Linha Basal	30`VM	60`VM	90`VM	120`VM
V _T 8 (n=6)	129 ± 2.68	134.4 ± 2.11	133.4 ± 2.24	132 ± 2.52	132.2 ± 3.02
V _T 27 (n=6)	122 ± 6.04	128.6 ± 6.43	127.4 ± 6.5	118.6 ± 7.64	114 ± 8.05

Os resultados estão expressos em média ± EP.

ANOVA – One way, (NS).

Pressão arterial média

Figura 1. Representação gráfica da pressão arterial média ao longo do tempo no grupo V_{T8} e V_{T27} .

Tabela 3. Parâmetros Fisiológicos durante o curso dos experimentos.

	Linha Basal	30' VM	120' VM
V_T8			
PaO ₂ , mmHg	79.48 ± 5.68	199.54 ± 36.86 ^a	210.22 ± 21.65 ^a
PaCO ₂ , mmHg	38.22 ± 6.76	35.96 ± 8.81	39.4 ± 7.87
pH	7.37 ± 0.04	7.36 ± 0.10	7.33 ± 0.118
BIC mmol/L	22.4 ± 1.09	24.32 ± 2.93	26 ± 3.99
Hb, g/dl	11.62 ± 0.76	11.64 ± 1.50	11.1 ± 1.04
Ht, %	35.92 ± 2.19	37.26 ± 3.73	34.2 ± 3.07
Lactato mmol/L	1.12 ± 0.35	1.4 ± 0.61	1.58 ± 0.74
V_T27			
PaO ₂ , mmHg	79.58 ± 8.43	190.94 ± 38.96 ^a	185.2 ± 19.55 ^a
PaCO ₂ , mmHg	31.14 ± 7.10	35.8 ± 4.39	37.48 ± 6.24
pH	7.38 ± 0.03	7.33 ± 0.06	7.35 ± 0.09
BIC mmol/L	22.98 ± 2.42	25.26 ± 3.89	23.88 ± 4.40
Hb, g/dl	14.05 ± 2.27	12.67 ± 1.17	11.60 ± 1.08
Ht, %	40.50 ± 5.05	38.95 ± 3.54	35.77 ± 3.39
Lactato mmol/L	1.7 ± 0.74	1.5 ± 0.27	1.4 ± 0.44

Valores apresentados em Média ± EP.

^ap<0.001 vs. 30'VM.

ANOVA – One way, (NS) – Student –Newman – Keuls pós-teste

4.1.8. Clearance de inulina (ml/min/100g PC)

Na TABELA 4 observamos que ao compararmos o “clearance” de inulina do grupo V_{T27} após 60 minutos de VM com os valores basais ($p<0,01$), obtivemos diminuição significativa deste valor. Esta queda foi evidenciada de forma mais acentuada após 90 ($p<0,001$) e 120 minutos de VM ($p<0,001$), FIGURA 2. No grupo V_{T8} não foi evidenciado alteração dos valores ao longo do tempo em comparação com os valores basais, linha basal, FIGURA 3.

4.1.9. Volume urinário (ml/min)

O volume urinário não se mostrou diferente entre os grupos V_{T8} e V_{T27} e ao longo do curso do experimento, TABELA 4.

4.1.10. FEH_2O (%), $FENa$ (%) e FEK (%)

Os valores de FEH_2O , $FENa$ e FEK não foram diferentes entre os grupos V_{T8} e V_{T27} e ao longo do curso do experimento, TABELA 4.

4.1.11. Ácido Tiobarbitúrico – TBARS (nanomoles/ml)

Não foi evidenciada diferença entre os grupos V_{T8} e V_{T27} em relação aos valores de TBARS, $V_{T8}= 3,97 \pm 0,27$; $V_{T27}= 4,02 \pm 0,45$, (NS).

4.1.12. eNOS

Não foi evidenciada diferença entre os grupos V_{T8} e V_{T27} em relação aos valores de eNOS, $V_{T8}= 94,25 \pm 2,75$; $V_{T27}= 96,25 \pm 2,39$, (NS).

Tabela 3. Função renal dos grupos V_T8 e V_T27 mensuradas no início (linha basal) e durante o experimento

	Linha Basal	30' VM	60' VM	90' VM	120' VM
V_T8					
Inulina (ml/min/100g PC)	0.80 ± 0.05	0.76 ± 0.04	0.67 ± 0.05 ^a	0.78 ± 0.05	0.72 ± 0.03 ^{a,b}
Débito urinário (ml/min)	0.015 ± 0.002	0.012 ± 0.08	0.022 ± 0.07	0.018 ± 0.006	0.014 ± 0.03
FEH ₂ O (%)	0.36 ± 0.05	0.22 ± 0.05	0.37 ± 0.04	0.3 ± 0,07	0.29 ± 0.03
FENa (%)	0.68 ± 0.30	0.22 ± 0.05	0.37 ± 0.19	0.30 ± 0.07	0.29 ± 0.07
FEK (%)	35.02 ± 5.44	19.92 ± 5.17	23.63 ± 3.81	26.53 ± 4.7	21.32 ± 4.41
V_T27					
Inulina (ml/min/100g PC)	0.95 ± 0.07	0.87 ± 0.06	0.60 ± 0.05	0.45 ± 0.05	0.40 ± 0.04
Débito urinário (ml/min)	0.017 ± 0.002	0.02 ± 0.01	0.025 ± 0.011	0.02 ± 0.005	0.012 ± 0.001
FEH ₂ O (%)	0.76 ± 0.27	0.58 ± 0.09	0.87 ± 0.24	0.76 ± 0.08	0.59 ± 0.05
FENa (%)	1.45 ± 0.51	1.03 ± 0.30	1.25 ± 0.63	0.72 ± 0.13	0.41 ± 0.04
FEK (%)	50.77 ± 15.74	22.7 ± 3.93	26.68 ± 8.58	23.7 ± 7.78	19.61 ± 1.60

VM, ventilação mecânica; FEH₂O, fração de excreção de água; FENa, fração de excreção de sódio; FEK, fração de excreção de potássio.

^a p < 0,01 vs. basal; ^b p < 0,001 vs. basal.

ANOVA - One-way, - Student – Newman – Keuls pós-teste.

Clearance de inulina – V_{T8}

Figura 2. Representação gráfica do clearance de inulina ao longo do tempo no grupo V_{T8} .

Nível de Significância entre tempos – V_{T8}

Teste estatístico de análise de variância ANOVA- pós teste Student –
Newman - Keuls

	Linha basal	30`VM	60`VM	90`VM	120`VM
30`VM	ns	-	-	-	-
60`VM	ns	ns	-	-	-
90`VM	ns	ns	ns	-	-
120`VM	ns	ns	ns	Ns	-

Clearance de inulina – V_T27

Figura 3. Representação gráfica do clearance de inulina ao longo do tempo no grupo V_T27.

Nível de Significância entre tempos – V_T27

Teste estatístico de análise de variância ANOVA- pós-teste Student – Newman - Keuls

	Linha basal	30` VM	60` VM	90` VM	120` VM
30` VM	ns	-	-	-	-
60` VM	<0,01	<0,01	-	-	-
90` VM	<0,001	<0,001	ns	-	-
120` VM	<0,001	<0,001	ns	ns	-

Nossos resultados demonstram que após 60 minutos de VM, o ritmo de filtração glomerular sofre importante queda, se tornando mais acentuada após 90 minutos de VM e sustentando estes valores após 120 minutos de VM no grupo com volume corrente elevado.

5. CONCLUSÕES

5. Conclusões

1. A ventilação mecânica com volume corrente elevado (V_T27) provoca redução da função renal de forma aguda em ratos normais.
2. A via do stress oxidativo mensurada pelo TBARS parece não estar envolvida agudamente com a redução da função renal.
3. 120 minutos de VM com 27ml/kg de volume corrente não foi suficiente para promover variações do eNOS.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Existe um interesse crescente na potencial relação entre o suporte ventilatório mecânico e o desenvolvimento de falência de órgãos à distância. Vários autores têm ressaltado este assunto como uma importante área de investigação científica^{12;16;47}.

A função renal tem sido abordada em vários estudos, no entanto, em sua maioria investigando os efeitos da instituição da pressão positiva e não especificamente de estratégias ventilatórias. A redução do débito urinário, por exemplo, têm sido extensivamente descrita na literatura com a instituição da pressão positiva, porém, os efeitos da pressão positiva no ritmo de filtração glomerular mensurados por padrão ouro (clearance de inulina) são menos esclarecedores³⁴.

Optamos por um modelo *in vivo*, Infelizmente a maioria dos modelos *in vivo* de animais dificulta o controle de todas as variáveis confundidoras, especialmente as variáveis extrapulmonares, este fato não pode ser ignorado em estudos que investigam a relação de estratégias pulmonares e seus efeitos em órgãos à distância.

Os experimentos pilotos permitiram a escolha de duas estratégias de volume corrente, V_T8 e V_T27 . As variações da Paw_m podem afetar o retorno venoso e a Pam , estes valores foram considerados, portanto, como fundamentais para se manterem estáveis entre as diferentes estratégias adotadas. A Paw_m não foi diferente entre os grupos estudados. Para equalizar esta condição, 3 cmH₂O de PEEP foram acrescentados ao grupo

V_{T8} , o efeito protetor da PEEP no colapso pulmonar pode ser uma variável confundidora. Embora não podemos excluir a possibilidade de recrutamento e derecrutamento alveolar no grupo sem PEEP (V_{T27}), nossa hipótese é que este mecanismo não ocorreu de forma significativa. No entanto, aceitamos que estes elementos podem interferir na interpretação dos resultados.

Valenza et al.⁴⁸ demonstrou ser viável modelos em ratos normais para investigar o efeito de diferentes estratégias de volume corrente empregado com lesões em órgão à distância. A média de volume corrente empregado no estudo citado foi de $29,8 \pm 2,9$ ml/kg e $9,9 \pm 0,8$ ml/kg, e o grupo com baixo volume corrente também recebeu PEEP de 3cmH₂O para manutenção da Paw_m . O estudo demonstrou um aumento do espaço de Bowman com colapso dos capilares glomerulares após 60 minutos de VM com volume corrente elevado, no entanto, a função renal não foi mensurada.

A manutenção da Paw pode preservar o fluxo sanguíneo regional, nossos resultados evidenciaram um valor similar entre os grupos, porém, supranormais comparados a ratos sem ventilação, provavelmente devido à expansão volêmica realizada no início do estudo (dose inicial de inulina). Quando a pressão intratorácica se eleva rapidamente, o volume central de sangue diminui⁴⁹, portanto, variações do débito cardíaco e da distribuição regional de sangue podem ter ocorrido durante a fase inspiratória, principalmente no grupo V_{T27} . Dorinsky et al.⁵⁰ demonstraram em cachorros ventilados por 30 minutos com PEEP de 14 cmH₂O um aumento do fluxo renal de 30% em relação à linha basal e uma redução de 60% no fluxo

hepático. Assumindo que estas condições são aplicáveis a ratos, implicaria em possíveis variações do fluxo sanguíneo renal no grupo V_T27 .

Os grupos apresentaram efetivamente volumes correntes diferentes, no entanto, devido ao ajuste da frequência respiratória e manutenção do volume minuto, não possível detectar variações significativas em relação aos níveis de PaO_2 e $PaCO_2$, bem como das demais variáveis fisiológicas investigadas.

Estratégias ventilatórias com baixas pressões ou com hiperdistensão provocam lesão no tecido pulmonar, não ocorreu colapso pulmonar no grupo V_T8 devido à adição de PEEP, e possivelmente não ocorreu maiores colapsos no grupo V_T27 como discutido previamente. Entretanto, mesmo se assumirmos que ventilação com baixas pressões ou hiperdistensão não ocorreram em nosso estudo, não podemos excluir a possibilidade de alguma sobrecarga no volume pulmonar ter ocorrido no grupo V_T27 . Uma recente investigação demonstrou em ratos saudáveis que a ventilação mecânica só foi preponderantemente lesiva após 3 horas de volumes correntes superiores a 27ml/kg²⁵.

Gurkan et al.³⁹ comparou diferentes estratégias de VM em um modelo de rato com lesão pulmonar induzida por ácido e demonstrou danos histológicos no pulmão e aumento dos níveis de interleucina 6 (IL-6) no tecido renal do grupo de ratos ventilados com volume corrente elevado, no entanto, a função renal foi mensurada.

Utilizando um modelo *in vivo* de lesão pulmonar por aspiração de ácido, Imai et al.⁴⁰ observou que estratégias ventilatórias lesivas induziram

apoptose de células renais e cursaram com elevações de marcadores bioquímicos indicando disfunção renal. A função renal não sofreu variação independente da estratégia ventilatória utilizada, no entanto, foi mensurada pela concentração de creatinina no plasma e não pelo clearance de inulina.

Choi et al.⁵¹ investigando o efeito de diferentes estratégias de volume corrente (20ml/kg versus 7ml/kg) por 90 minutos no vazamento microvascular sistêmico observou significativo aumento da perda microvascular de azul de metileno no rim. A função renal foi mensurada por coleta de urina em gaiola metabólica por 24 horas e os níveis de creatinina sérica, proteinúria, albumina e sódio foram mensurados. A função renal pela concentração de creatinina não foi diferente entre os grupos estudados. Este estudo não mensurou possíveis variações agudas da função renal durante a permanência na ventilação mecânica e não suplementou oxigênio durante a ventilação mecânica, não apresentado dados de valores gasométricos de ambos os grupos.

Nossos resultados demonstraram uma redução acentuada do clearance de inulina após 60 minutos de VM no grupo V_T27 e ainda mais acentuada após 90 minutos de VM em relação ao período basal. A redução do clearance de inulina significa redução do ritmo de filtração glomerular e conseqüente falência renal aguda. Estes dados contrariam os achados de Hoag et al.⁵² recentemente investigando o efeito da lesão pulmonar induzida por aspiração de ácido na função renal, não observou variações do clearance de inulina no grupo de animais ventilados com 25ml/kg com ou sem lesão pulmonar induzida por aspiração de ácido. Esta diferença de

resultados pode ser explicada pela diferença dos animais estudados (cachorros) em relação ao nosso modelo (ratos). A ventilação com elevados volumes corrente pode representar efeitos bem menos agressores em animais maiores.

Esta diferença de resultados observada entre o nosso estudo e o estudo de Hoag et al.⁵² ressalta a contribuição de nossos dados para a fisiopatologia da relação entre a ventilação mecânica e a função renal em modelos de ratos normais.

Uma série de mecanismos pode explicar a redução do RFG após 60 minutos de VM com V_T 27, incluindo redução do débito cardíaco³⁶, redistribuição do fluxo sanguíneo intrarenal⁵³, estimulação de vias simpáticas e hormonais⁵⁴, e liberação de mediadores inflamatórios como consequência da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica^{32;37}. Ambos os grupos permaneceram sobre as mesmas condições fisiológicas para isolar o efeito do volume corrente *per se*.

Nenhuma outra alteração na função renal como, fração de excreção de água, sódio e potássio foram observados. Estes dados nos permitem pensar de que o volume corrente elevado implica em alterações nos mecanismos relacionados a filtração glomerular. O débito urinário não foi diferente entre os grupos, o que reforça o fato de que ambos os grupos estavam sobre as mesmas condições fisiológicas resultantes da pressão positiva.

Os aspectos hemodinâmicos relacionados a pressão positiva foi em parte validado em um modelo canino por Qvist et al.⁵⁵ demonstrando que um

débito cardíaco estável na presença de pressão positiva não está associado com a redução do RFG ou do débito urinário. Este dado reforça a hipótese que ambos os grupos estudados não sofreram influências hemodinâmicas significativas, embora não mensurado o débito cardíaco.

A expressão de eNOS no rim não se mostrou diferente entre os grupos. De fato não está claro qual o mecanismo que conecta a distensão pulmonar com órgãos à distância. O óxido nítrico tem sido demonstrado como uma dos mecanismos que regula as funções celulares e possui importante papel no fluxo sanguíneo renal. Takenaka et al.⁵⁶ descreveu um potencial efeito anti-inflamatório do eNOS expresso no pulmão e poderia ter um efeito protetor no pulmão da lesão induzida pelo ventilador pela inibição da produção de citocinas inflamatórias que estão associadas a infiltração de neutrófilos nos espaços aéreos. Esta hipótese pode explicar o fato de que estudos como o de Choi et al.⁵¹ não terem observados queda da função renal após 24 horas de interrupção da VM, uma vez que, ao contrário de nossos resultados o grupo ventilado com elevado volume corrente apresentou maior expressão de eNOS no tecido renal.

As complicadas interações do óxido nítrico com outros fatores em modelos *in vivo* dificultam a análise dos mecanismos envolvidos, mesmo assumindo a tendência de que o fluxo sanguíneo renal se manteve constante além de possíveis variações na pressão de perfusão renal por mecanismos intrínsecos, O RFG foi afetado pela estratégia ventilatória adotada.

As substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmáticas são marcadores de peroxidação lipídica e consequentemente de estresse oxidativo. O TBARS não se demonstrou diferente entre os grupos estudados, 120 minutos de VM com os volumes empregados não foram suficientes para aumentar o estresse oxidativo. O estresse oxidativo e inflamação provocam disfunção endotelial e o endotélio sendo ao mesmo tempo fonte e alvo dos produtos oxidantes participam da resposta inflamatória^{57;58}.

Em resumo, nossos resultados demonstraram que a ventilação mecânica com 27ml/kg provocou queda da filtração glomerular. Este resultado foi observado mesmo isolando ao máximo a variável do volume corrente e evitando mecanismos confundidores. A queda da filtração glomerular não foi acompanhada por aumento da expressão de eNOS no rim e TBARS sérico. Esses resultados produzem importantes informações sobre a relação do volume corrente utilizado e seus efeitos sistêmicos em ratos normais.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS:

01. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, 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.
02. Brochard I, Roudot-thoraval F, Roupie E, Delclaux C, Chastre J, Fernandez-mondejar E, et al. Tidal volume reduction for prevention of ventilator-induced lung injury in acute respiratory distress syndrome. The multicenter trial group on tidal volume reduction in ARDS. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1831-8.
03. Ferguson ND, Frutos-Vivar F, Esteban A, Anzueto A, Alia I, Brower RG, et al. Airway pressures, tidal volumes, and mortality in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2005;33:21-30.
04. Amato M, Brochard L, Stewart T, Brower R. Metaanalysis of tidal volume in ards. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:612-3.
05. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:294-323.
06. Plotz FB. Ventilator-induced lung injury. *Intensive Care Med*. 2001;27:452.
07. Pinhu L, Whitehead T, Evans T, Griffiths M. Ventilator-associated lung injury. *Lancet*. 2003;361:332-40.
08. Dos Santos CC, Slutsky AS. Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *J Appl Physiol*. 2000;89:1645-55.
09. Fessler HE, Brower RG. Protocols for lung protective ventilation. *Crit*

- Care Med.* 2005;33(3 Suppl):223-S227.
10. Farias LL, Faffe DS, Xisto DG, Santana MC, Lassance R, Prota LF, et al. Positive end-expiratory pressure prevents lung mechanical stress caused by recruitment/derecruitment. *J Appl Physiol.* 2005;98:53-61.
 11. Brower RG, Lanken PN, Macintyre N, Matthay MA, Morris A, Ancukiewicz M, et al. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2004;351:327-36.
 12. Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury: from barotrauma to biotrauma. *Respir Care.* 2005;50:646-59.
 13. Uhlig S, Ranieri M, Slutsky AS. Biotrauma hypothesis of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:314-5.
 14. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De TR, Dayer JM, Brienza A, et al. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA.* 1999;282:54-61.
 15. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 2000;342:1301-8.
 16. Plotz FB, Slutsky AS, Van Vught AJ, Heijnen CJ. Ventilator-induced lung injury and multiple system organ failure: a critical review of facts and hypotheses. *Intensive Care Med.* 2004;30:1865-72.
 17. Plotz FB, Vreugdenhil HA, Van Vught AJ, Heijnen CJ. Mechanical ventilation and multiple organ failure. *Lancet.* 2003;361:1654.
 18. 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.
19. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis.* 1988;137:1159-64.
 20. Dreyfuss D, Saumon G. Barotrauma is volutrauma, but which volume is the one responsible? *Intensive Care Med.* 1992;18:139-41.
 21. Dreyfuss D, Soler P, Saumon G. Spontaneous resolution of pulmonary edema caused by short periods of cyclic overinflation. *J Appl Physiol.* 1992;72:2081-9.
 22. Hernandez LA, Peevy KJ, Moise AA, Parker JC. Chest wall restriction limits high airway pressure-induced lung injury in young rabbits. *J Appl Physiol.* 1989;66:2364-8.
 23. Carlton DP, Cummings JJ, Scheerer RG, Poulain FR, Bland RD. Lung overexpansion increases pulmonary microvascular protein permeability in young lambs. *J Appl Physiol.* 1990;69:577-83.
 24. Peevy KJ, Hernandez LA, Moise AA, Parker JC. Barotrauma and microvascular injury in lungs of nonadult rabbits: effect of ventilation pattern. *Crit Care Med.* 1990;18:634-7.
 25. Walder B, Fontao E, Totsch M, Morel DR. Time and tidal volume-dependent ventilator-induced lung injury in healthy rats. *Eur J Anaesthesiol.* 2005;22:785-94.
 26. Esson MI, Schrier RW. Diagnosis and treatment of acute tubular

- necrosis. *Ann Intern Med.* 2002;137:744-52.
27. Liu KD. Molecular mechanisms of recovery from acute renal failure. *Crit Care Med.* 2003;31(8 Suppl):S572-S581.
 28. Groeneveld AB, Tran DD, Van Der MJ, Nauta JJ, Thijs LG. Acute renal failure in the medical intensive care unit: predisposing, complicating factors and outcome. *Nephron.* 1991;59:602-10.
 29. Chertow GM, Lazarus JM, Paganini EP, Allgren RL, Lafayette RA, Sayegh MH. Predictors of mortality and the provision of dialysis in patients with acute tubular necrosis. The Auriculin Anaritide Acute Renal Failure Study Group. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:692-8.
 30. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA.* 2000;284:43-4.
 31. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med.* 1996;334:1448-60.
 32. Kuiper JW, Groeneveld AB, Slutsky AS, Plotz FB. Mechanical ventilation and acute renal failure. *Crit Care Med.* 2005;33:1408-15.
 33. Tremblay LN, Miatto D, Hamid Q, Govindarajan A, Slutsky AS. Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 messenger RNA. *Crit Care Med.* 2002;30:1693-700.
 34. Pannu N, Mehta RL. Effect Of Mechanical Ventilation On The Kidney. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004;18:189-203.
 35. Pannu N, Mehta RL. Mechanical ventilation and renal function: an area for concern? *Am J Kidney Dis.* 2002;39:616-24.
 36. Zillig B, Schuler G, Truniger B. Renal function and intrarenal

- hemodynamics in acutely hypoxic and hypercapnic rats. *Kidney Int.* 1978;14:58-67.
37. Matsumura LK, Russo EM, Nakatani J, Figueiredo JF, Dos Santos ML. Hemodynamic and renal function changes in mechanical intermittent positive pressure respiration. Experimental study in dogs. *Amb Rev Assoc Med Bras.* 1982;28:96-100.
38. Annat G, Viale JP, Bui XB, Hadj AO, Benzoni D, Vincent M, et al. Effect of peep ventilation on renal function, plasma renin, aldosterone, neurophysins and urinary adh, and prostaglandins. *Anesthesiology.* 1983;58:136-41.
39. Gurkan OU, O'donnell C, Brower R, Ruckdeschel E, Becker PM. Differential effects of mechanical ventilatory strategy on lung injury and systemic organ inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285:710-718.
40. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, de PM, Fischer S, Edwards V, et al. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA.* 2003;289:2104-12.
41. Fuhr J, Kaczmarczyk J, Kruttgen CD. A simple colorimetric method of inulin determination in renal clearance studies on metabolically normal subjects and diabetics. *Klin Wochenschr.* 1955;33:729-30.
42. Wardle EN. Cellular oxidative processes in relation to renal disease. *Am J Nephrol.* 2005;25:13-22.
43. Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension.* 2002;39:135-41.
44. Walker PD, Shah SV. Reactive oxygen metabolites in endotoxin-

- induced acute renal failure in rats. *Kidney Int.* 1990;38:1125-32.
45. Romero F, Rodriguez-Iturbe B, Parra G, Gonzalez L, Herrera-Acosta J, Tapia E. Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. *Kidney Int.* 1999;55:945-55.
 46. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-8.
 47. Slutsky AS, Tremblay LN. Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor? *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1721-5.
 48. 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;28:3697-704.
 49. Sykes MK, Adams AP, Finlay WE, McCormick PW, Economides A. The effects of variations in end-expiratory inflation pressure on cardiorespiratory function in normo-, hypo-and hypervolaemic dogs. *Br J Anaesth.* 1970;42:669-77.
 50. Dorinsky PM, Whitcomb ME. The effect of peep on cardiac output. *Chest.* 1983;84:210-6.
 51. Choi WI, Quinn DA, Park KM, Moufarrej RK, Jafari B, Syrkina O, et al. Systemic microvascular leak in an in vivo rat model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:1627-32.
 52. Hoag JB, Liu M, Easley RB, Britos-Bray MF, Kesari P, Hassoun H, et al. Effects of acid aspiration-induced acute lung injury on kidney function. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294:900-908.
 53. Dreyfuss D, Ricard JD. Acute lung injury and bacterial infection. *Clin*

Chest Med. 2005;26:105-12.

54. Matsumura LK, Ajzen H, Chacra AR, Ratto OR, Dos-Santos ML. Effect of positive pressure breathing on plasma antidiuretic hormone and renal function in dogs. *Braz J Med Biol Res.* 1983;16:261-70.
55. Qvist J, Pontoppidan H, Wilson RS, Lowenstein E, Laver MB. Hemodynamic responses to mechanical ventilation with peep: the effect of hypervolemia. *Anesthesiology.* 1975;42:45-55.
56. Takenaka K, Nishimura Y, Nishiuma T, Sakashita A, Yamashita T, Kobayashi K, et al. Ventilator-induced lung injury is reduced in transgenic mice that overexpress endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290:1078-1086.
57. Cheng ZJ, Vaskonen T, Tikkanen I, Nurminen K, Ruskoaho H, Vapaatalo H, et al. Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Hypertension.* 2001;37:433-9.
58. Briguori C, Manganelli F, Scarpato P, Elia PP, Golia B, Riviezzo G, et al. Acetylcysteine and contrast agent-associated nephrotoxicity. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:298-303.

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Applied Physiology*.

Manuscript ID: JAPPL-91284-2008

Title: Renal function is affected by high tidal volume ventilation in an In vivo healthy rat model

Authors:

Luque, Alexandre

Shimizu, Maria Heloisa

Andrade, Lucia

Sanches, Talita

Seguro, Antonio

Date Submitted: 25th Sep 08 16:19:03

Current Stage: Manuscript Under Review

**Renal function is affected by high tidal volume ventilation in an *In vivo* healthy rat
model**

Alexandre Luque; Maria Heloisa Massola Shimizu; Lucia Andrade, Talita R.

Sanches and Antonio Carlos Seguro.

LIM/12 - Nephrology Department - University of São Paulo. School of Medicine

Running head: Renal Function and mechanical ventilation strategy

Subject of Manuscript: Pathophysiology of mechanisms of ventilator-induced lung injury
and renal failure

Corresponding author: Alexandre Luque
Laboratorio Pesquisa Basica LIM/12
Faculdade de Medicina USP
Brazil
E-mail: aleluque@terra.com.br
Av. Dr. Arnaldo, 455 3o. andar, sala 3310
CEP: 01246-000 São Paulo, SP
Phone/Fax: 55 11 3088-2267

Abstract

Purpose: We examined the effects of two strategies of tidal volume [8ml/Kg and 27ml/kg] on renal function.

Design: Controlled randomized animal study.

Setting: University animal research laboratory.

Subject: Anesthetized, paralyzed, and mechanically ventilated male Wistar rats.

Interventions: Two groups of six rats each were randomized to receive ventilation strategies as follows: a) V_T : 8ml/kg; frequency 61.5 ± 0.92 beats/min; positive end-expiratory pressure, 3.0 cm H₂O; and peak inspiratory airway pressure [Paw_p], 11.8 ± 2 cm H₂O; and b) V_T : 27ml/kg; frequency 33.6 ± 1.56 beats/min; positive end-expiratory pressure, 0 cm H₂O; and peak inspiratory airway pressure [Paw_p], 22.7 ± 4 cm H₂O; Both groups with the same mean airway pressure [Paw_m] 6.33 ± 0.21 and 6.50 ± 0.22 cm H₂O.

Measurements and results: Inulin clearance [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{BW}^{-1}$] decreased in rats that received V_T : 27ml/kg after 60 minutes of mechanical ventilation [MV] and even more significant at 90 minutes of MV [0.45 ± 0.05] compared with basal values [0.95 ± 0.07], $p < 0.001$, despite no differences in hemodynamic or gasometric variables between groups. No inulin clearance alteration was observed in V_T : 8ml/kg group [0.8 ± 0.05 basal vs. 0.72 ± 0.03 120 min of MV].

Conclusion: We concluded that GFR is affected by different strategies of MV, and after 60 minutes of high tidal volume [27ml/kg] ventilation the renal function marked decreased, getting worse after 90 minutes.

Key words: mechanical ventilation; renal function; Inulin clearance; rat.

INTRODUCTION

Mechanical Ventilation (MV) has been recently associated with development of distal organ failure which one is the cause of death in most patients with acute respiratory distress syndrome rather than hypoxia(14). It is also a contributor factor for renal failure in trauma patients(29), and risk factor for dialysis and mortality rate in intensive care unit(2). The ventilatory strategy is correlated with release of inflammatory mediators, and a lung-protective strategy attenuated this local and systemic cytokine response(19) and also resulted in lower mortality than conventional ventilation(26). Currently, to our knowledge, no studies have investigated the effects of mechanical ventilatory strategy per se on rats renal function. The aim of the present study was to explore the hypothesis that mechanical ventilatory strategy may contribute to decreased renal function. We set out to look for a model that would allow us to isolate, as much as possible, the effect of mechanical ventilatory strategy.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Animals

For this study, male adult Wistar rats that weighed 250 to 450 g were used provided by the University Of São Paulo School Of Medicine according to the ethics principles of animal investigation. The protocol was approved by the institutional animal care committee. A detailed series of pilot studies was performed to determine ventilation strategies characterized by different tidal volumes, but with similar mean airway pressure (mean Paw), mean arterial pressure, oxygenation, and acid-base status. We developed tests with varying tidal volume, considering high tidal volume 27 ml/kg because recent publication of time and tidal volume-dependent ventilator-induced lung injury in healthy rats while maintaining constant mean Paws by changing other ventilatory variables (positive end-expiratory pressure and frequency)(27; 30). We also preserved constant oxygenation levels

by using 50% inspiratory fraction of oxygen, while we kept the acid-base status constant by modulating frequency when needed guided by blood PaCO₂ analysis at time intervals.

From these pilot studies, we learned that very different tidal volume settings of 8ml/kg or 27ml/kg could be maintained while keeping similar Paw_m, mean arterial pressure, oxygenation, and acid-base status levels. The studies described in this article were then performed by using two groups of six healthy rats each randomized to receive tidal volumes equal to 8ml/kg (V_T8) or 27ml/kg (V_T27). The animals were anesthetized with 50-mg/kg body weight (BW) of sodium pentobarbital, administered intraperitoneally. The rats were tracheostomized with a 14-gauge tube catheter and spontaneous breathing was maintained.

To control mean arterial pressure and to allow blood sampling at different time points to measure gas tensions and hemoglobin saturation (1620 pH/ blood gas analyzer and 682 CO-oximeter, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA), the right carotid artery was catheterized with a PE-60 catheter. The left jugular vein was cannulated with a PE-60 catheter for infusion of inulin and fluids. In order to collect urine samples, the urinary bladder was cannulated with a PE-240 catheter by suprapubic incision. After 30 minutes of spontaneous breathing animals were then ventilated with a small animal ventilator (Atlanta, Takaoka, Sao Paulo, BR) and received an intravenous injection of 0.825 mg/kg pancuronium bromide when ventilation starts and 25% of dose was reposed when inspiratory effort was detected.

Clearance studies

After completion of the surgical procedure, a loading dose of inulin (100 mg/kg BW diluted in 0.9% saline) was administered through the jugular vein. Subsequently, a constant infusion of inulin (10 mg/kg BW in 0.9% saline) was started and continued at 0.04 ml/min throughout the experiment. Five urine samples were collected at 30-min intervals (1 sample at spontaneous breathing and 4 under mechanical ventilation). Blood samples were obtained at the beginning and at the end of the experiment. After At the end of the experiment, after being flushed with saline, the left kidney was perfused *in situ* at the measured arterial pressure with Duboscq-Brazil solution. After being fixed, the renal tissue was weighed, and

two sections were postfixed in buffered 10% formaldehyde solution. The material was embedded in paraffin for assessment of glomerular and renal cortical interstitial injury. The right kidney was removed and frozen in liquid nitrogen.

Blood and urine inulin were determined by the anthrone method, and sodium and potassium concentrations were measured by flame photometry (model 143; Instrumentation laboratory, Lexington, MA). Serum levels TBARS, Glomerular filtration rate (GFR), Urinary osmolality in (Advanced Osmometer model 3D3) was calculated and eNOS were measurement.

Preparation of Renal Samples for eNOS Protein Expression

Kidney samples were homogenized in ice-cold isolation solution (200 mM mannitol, 80 mM HEPES, 41 mM KOH (pH 7.5) that contained protease inhibitors (cocktail protease inhibitor, Sigma) using a Teflon pestle glass homogenizer (Schmidt and Co). The homogenates were centrifuged at low speed (3000 x g) for 15 min at 4°C to remove nuclei and cell debris. The pellets were suspended in isolation solution with proteases inhibitors. Protein amounts were determined by the Bradford assay method.

Electrophoresis and Immunoblotting

For evaluation of the eNOS isoform, 100 µg of total protein from each sample was separated on an 8% polyacrylamide gel and transferred to a PVDF membrane. Immunoblotting was performed with antibody to eNOS diluted 1:2000 in Tris-buffered saline (TBS) and Tween 0.1%. Immunodetection was accomplished using the appropriate anti-mouse horseradish peroxidase-linked secondary antibody (dilution 1:2000 in TBS and 0.1% Tween) and the enhanced chemiluminescence kit (Amersham).

For controlling for loading, blots were incubated with actin antibody (1:3000, Santa Cruz Biotechnology). The labeling was visualized with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody anti-goat (1:5000; Sigma).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS (peroxidation markers) serum levels were determined using thiobarbituric acid assay. Briefly, 0.2-mL serum sample was diluted in 0.8 mL of distilled water. Immediately after that, 1 mL of 17.5% trichloroacetic acid (TCA) was added. Following the addition of 1 mL of 0.6% thiobarbituric acid, pH 2, the sample was placed in a boiling water bath for 15 minutes and then allowed to cool. Then, 1 mL of 70% TCA was added and the mixture was allowed to incubate for 20 minutes. The sample was then centrifuged for 15 minutes at 2000 rpm. Optical density of the supernatant was read at 534 nm against a reagent blank using a spectrophotometer. The amount of TBARS, in nanomoles, was calculated using a molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Serum levels of TBARS were expressed as nanomoles/mL.

Statistical Analysis

Results are presented as mean $\pm$ SEM. In order to verify the effect of high tidal volume ventilation in renal function, the control group was compared to the high tidal volume group using ANOVA and Student-Newman-Keuls post-test. We also used *t*-test as appropriate. Statistical significance was established at $p < 0.05$. Statistics were performed by using dedicated software (Prisma 3.0).

RESULTS

We studied a total of 15 rats (weight, 240–435 g), we first randomized 12 rats. However, because of two rats died after 60 minutes of high tidal volume mechanical ventilation and 1 rat died after 90 minutes of control mechanical ventilation, we, therefore, subsequently randomized three more animals to replace the missing ones and completed the planned study groups of six rats each. We observed a death rate of 14.28% in control ventilation group and 25% in high tidal volume group.

The final ventilation strategies of the two groups are shown in Table 1. The frequency was lower in the high tidal volume group (30 ± 5 vs. 60 ± 7 – $p < 0.0001$). No positive

end expiratory pressure developed dynamically. Mean Paws was no difference over time between groups (6.33 ± 0.21 vs. 6.5 ± 0.22).

Table 2 shows mean arterial pressure and physiologic variables for the two groups such as blood analysis. No difference of mean arterial pressure was observed between groups during the study, whereas control ventilation rats showed only minor variations between inspiration and expiration, high tidal volume rats showed marked temporal variations in blood pressure, but no quantitative measurements was registered. Animals were normoxic and normocapnic, with no differences between groups at the basal moment, after mechanical ventilation begin, both groups had similar increase in PaO_2 values associated with FiO_2 and keep this values with no statistical difference at the end of experiment. Lactate values did not showed difference between groups over the time.

High tidal volume ventilation is associated with decreased of GFR.

The results of clearance studies are presented in Table 3 and Fig. 1. Rats ventilated with high tidal volume (27ml/kg) presented significantly decreased inulin clearance after 60 minutes of mechanical ventilation, indicating acute renal insufficiency (0.6 ± 0.05) in comparison with basal values (0.95 ± 0.07), $p < 0.001$. We observed decreased in inulin clearance in rats that received high tidal volume, after 60 minutes of ventilation and even more significant at 90 minutes of ventilation (0.45 ± 0.05) compared with basal values. No inulin clearance alteration was observed in control ventilation group (0.8 ± 0.05 basal vs. 0.72 ± 0.03 120 min of MV). No other renal function measurements such as fraction of water, sodium and potassium excretion were different between groups. Both groups had similar and no significant variations among urinary output.

TBARS and Mechanical Ventilation strategy

No difference were observed between groups in relation to TBARS values, therefore, two hours of 8ml/kg or 27ml/kg of ventilation was not able to induced oxidative stress detected by TBARS methods (3.97 ± 0.27 vs. 4.02 ± 0.45 respectively) as showed in table 3.

Mechanical ventilation and eNOS.

Measured by immunoblot analysis eNOS was detected at 140 kD in the kidney tissue from V_T8 and V_T27 groups. Densitometric analysis did not showed a significant difference of protein level of eNOS in the kidney between groups, 94.25±2.75% and 96.25±2.39%, respectively.

DISCUSSION

There is growing interest in a potential relationship between mechanical ventilatory support and the development of distal organ failure. Several authors have discussed as an important area to concern(17; 22; 23). In relation with renal failure many studies showed an immediate decline in urine output in association with mechanical ventilation, but most of all analyzing the effect of instituted positive pressure(16). The effect of ventilation on glomerular filtration rate is less clear, and had not addressed the renal function measured by gold standard (inulin clearance) with different strategy of mechanical ventilation. Most of the literature comes from animal studies that permit the freedom to control for the different variables. Analyzing different strategies of mechanical ventilation and distal organ failure, Investigators have performed studies on isolated lungs, isolated-perfused lungs, and *in vivo* animals. However, the more complex the model (the extreme being the *in vivo* animal), the more difficult it is to isolate the effects of a single variable, such as mechanical ventilatory support. Unfortunately, most *in vivo* animal models either lack stability or have difficulty in controlling for extrapulmonary factors. These, of course, cannot be ignored in a study of the effects of mechanical ventilatory support on distal organs. We, therefore, set out to address these limitations with a full *in vivo* model.

We decided to work with rats because of literature references and, most of all, because our experience in studied renal function in rats model(3; 20; 21). We performed an extended set of pilot studies to find ventilatory strategies allowing us to vary tidal volume, while simultaneously keeping similar mean Paw, mean arterial pressure, oxygenation, and

acid-base status constant. Some information available in literature help us a lot to identify the best combination of tidal volume that characterized different strategies in health rat lungs, we decided that the best way to isolate distal organ changes secondary to mechanical ventilatory support was to study intact, normal animals.

We decided to set tidal volume to either 8ml/kg or 27ml/kg. Variations in Paw may affect venous return and Mean Paw was felt to be an important index to maintain constant between different ventilation strategies. Mean Paws were not statistically different between groups (6.33 ± 0.21 cm H₂O for 8ml/kg group and 6.50 ± 0.22 cm H₂O). To satisfy the mean Paw equality condition, we decided to add positive end-expiratory pressure to the conventional group (3 cmH₂O cm H₂O). The protective role of positive end-expiratory pressure on end-expiratory lung collapse may be a confounding factor. However, although we cannot exclude the fact that intratidal alveolar recruitment and derecruitment occurred in the group without positive end-expiratory pressure (27ml/kg), we hypothesize this did not occur to significant degree. Therefore, we accept that this element is a possible bias because of absence of positive end-expiratory pressure in the 27ml/kg group.

Valenza and colleagues(27) showed that it is possible to study the effects of mechanical ventilatory support on organs distal to the lungs by means of an *in vivo* healthy rat model. The mean tidal volume for the both groups studied were 9.9 ± 0.8 and 29.8 ± 2.9 , and the authors also provide different frequency and PEEP to obtain the same mean airway pressure. They demonstrated that kidneys from rats ventilated with high tidal volume showed increased Bowman's space with collapse of the glomerular capillaries after 60 minutes of ventilation, but renal function was not measured.

We sought to maintain mean arterial pressure values to preserve regional blood flow. However, the values we obtained were supranormal but similar in the both groups, probably because we had to performed inulin prime at begin of experiment as described in methods. When intrathoracic pressure suddenly increases, central blood volume diminishes(24). Marked changes in cardiac output and regional redistribution phenomena are, therefore, likely during high tidal volume ventilation. The effect of positive end expiratory pressure (PEEP) on regional flow was showed by Dorinsky and Withcomb(4), 30 minutes

with 14 cmH₂O of PEEP in dogs increased renal blood flow by 30% from baseline and decreased by 60% the liver flow. Assuming this were the case for rats as well, it would imply continuous changes in regional blood flow were occurring in group with high tidal volume ventilation.

Despite the differing ventilation strategies, the metabolic imbalances are unlikely to have confounded our results, animals from the two groups were both well oxygenated throughout the experiment and had similar pH, PaCO₂, BIC, and base excess, as show in table 2.

Both ventilation at low Paws and overstretching produce lung injury, there was no lung collapse at end-expiration in the 8ml/kg group because of positive end-expiratory pressure, and possibly is unlikely to have been any major collapse in the 27ml/kg group, as discussed. However, even if we assume that ventilation at low Paws and true overstretching did not occur, we may not exclude that some kind of lung volume load occurred in the 27ml/kg group. Cilley and colleagues showed moderate lung inflation (20ml/kg) in rats may indeed produced lung injury. But a recently investigation showed in normal rats the preponderant effect of the duration (13) of 'aggressive' ventilation and the cut-off value of the level of V_T applied (27mL/kg) to produce mechanics and clinical deteriorations(30).

Gurkan and colleagues(7), comparing different ventilation strategies in an acid-induced lung inflammation rat model, demonstrated histologic lung damage and increased levels of pulmonary, hepatic, and renal interleukin (IL)-6 levels after mechanical ventilation with high tidal volumes. However, renal function was not studied.

Using an *in vivo* animal model of acid aspiration, Imai et al(10) demonstrated that an injurious ventilatory strategy increased epithelial cell apoptosis in the kidney and lead to increased levels of biochemical markers indicating renal dysfunction. The lack of information relating mechanical ventilatory support per se and renal function measured by gold standard method (inulin clearance) encouraged us to first verify if exist this relation, and perhaps is more relevant than identified the mechanism that links lung stretch with alterations in the kidney.

Our results showed a marked reduced inulin clearance after 60 minutes of mechanical ventilation with 27ml/kg and even worse after 90 minutes. The reduction of inulin clearance means decreased glomerular filtration rate (GFR) and consequently acute renal failure. All studies that addressed the measurement of GFR associated with mechanical ventilation analyzed only the effect of institution of positive pressure or PEEP (1; 5; 6; 8; 11; 12; 15; 18; 28) and no different strategies with tidal volume *per se*. Hoag et al(9) recently observed no alterations in renal function (inulin clearance) with or without lung injury in dogs submitted to 25ml/kg of tidal volume, this difference can be probably justified to different impact of tidal volume in larger animals.

A number of mechanisms can explain the effect of marked reduced in GFR after 60 minutes of 27ml/kg ventilation, including a reduction in cardiac output, redistribution of intrarenal blood flow, stimulation of sympathetic and hormonal pathways, and release of systemic inflammatory mediators as a consequence of ventilator induced lung injury. We kept the both groups with the same physiologic conditions to isolate the effect of different strategies.

No other alterations in renal function such as fraction of water, sodium and potassium excretion were different between groups. This leads us to think that the effect of high tidal volume imply in alteration to mechanisms related to glomerular filtration. The urinary output was not different between groups, which reinforce the fact the both groups were under the same effect of positive pressure (same mean airway pressure).

We do not observed a statistical difference between groups of eNOS expression in the kidney. In fact it is not clear the whole mechanism that links lung stretch with distal organ failure. Nitric oxide (NO) has been show to regulate multiple cellular functions and has an important effect on renal blood flow. Takenaka et al. (25) describe a potencial anti-inflammatory effect of eNOS expressed in the lungs and may protect the lung from VILI by inhibiting the production of inflammatory chemokines and cytokines that are associated with neutrophil infiltration into the air space. This hypothesis can explain the fact that studies analyzing renal function after 24 hours of stopped high tidal ventilation did not observed differences in creatinine clearance(10).

The complicated interactions of NO with other factors *in vivo* hinder analysis of the mechanisms involved, even assuming the tendency to remain constant the renal blood flow despite fluctuations in perfusion pressure by intrinsic mechanisms, GFR was affected in the V_T27 group in our model.

These findings support the importance of our results to observe an acute alteration in renal function measured with a gold standard method in a rat model, even very well controlled we can not exclude hemodynamic causes but reinforce the hypothesis that in an acute observation of the effects of high tidal volume ventilation, a reduction in GFR may be relevant.

We concluded that GFR is acutely affected by different strategies of mechanical ventilation, and after 60 minutes of high tidal volume (27ml/kg) ventilation the renal function marked decreased, getting worse after 90 minutes of the present model. 120 minutes of V_T27 group ventilation was not able in this model to detect a variation in eNOS expression in the kidney when compared to V_T8 group, and this acute reduction of GFR may not be related to oxidative stress measured by TBARS.

Acknowledgments

We would like to thank Marcelo Costa, Research Division, Takaoka-Brazil, for excellent technical assistance.

Table 1. Ventilatory variables between groups.

	V _T 8	V _T 27
Frequency (beats/min)	61.5±0.92	33.6±1.56*
Paw _p (cmH ₂ O)	11.8±2	22.7±4*
Paw _m (cm H ₂ O)	6.33±0.21	6.50±0.22

Paw_p, peak airway pressure; Paw_m, mean airway pressure.

* $p < .0001$, 8ml/kg vs. 27ml/kg.

unpaired T-test

Table 2. Physiologic variables over time between two groups.

	Basal Line	30' MV	120' MV
V_T8			
MAP, mmHg	129 (±6.00)	129.6 (±14.67)	132.2 (±6.76)
PaO ₂ , Torr	79.48 (±5.68)	199.54 (±36.86)*	210.22 (±21.65)*
PaCO ₂ , Torr	38.22 (±6.76)	35.96 (±8.81)	39.4 (±7.87)
pH	7.37 (±0.04)	7.36 (±0.10)	7.33 (±0.118)
BIC mmol/L	22.4 (±1.09)	24.32 (±2.93)	26 (±3.99)
SaO ₂ %	94 (±2.73)	95(±3)	93(±1.7)
Hb, g/dl	11.62 (±0.76)	11.64 (±1.50)	11.1 (±1.04)
Ht,%	35.92 (±2.19)	37.26 (±3.73)	34.2 (±3.07)
Lactate mmol/L	1.12 (±0.35)	1.4 (±0.61)	1.58 (±0.74)
V_T27			
MAP, mmHg	122 (±13.50)	134,4 (±4.72)	114 (±18.01)
PaO ₂ , Torr	79.58 (±8.43)	190.94 (±38.96)*	185.2 (±19.55)*
PaCO ₂ , Torr	31.14 (±7.10)	35.8 (±4.39)	37.48 (±6.24)
pH	7.38 (±0.03)	7.33 (±0.06)	7.35(±0.09)
BIC mmol/L	22.98 (±2.42)	25.26(±3.89)	23.88 (±4.40)
SaO ₂ %	93(±2.3)	96(±1.5)	91(±1.2)
Hb, g/dl	14.05 (±2.27)	12.67 (±1.17)	11.60 (±1.08)
Ht,%	40.50 (±5.05)	38.95 (±3.54)	35.77 (±3.39)
Lactate mmol/L	1.7 (±0.74)	1.5 (±0.27)	1.4 (±0.44)

MV, mechanical ventilation; Basal Line, 30 minutes from randomization; 120 minutes from randomization; MAP, mean arterial pressure; PaO₂, oxygen arterial blood gas tension; PaCO₂, carbon dioxide arterial blood gas tension; BIC, bicarbonate; SaO₂, oxygen hemoglobin saturation; Hb, hemoglobin; HT, hematocrit; Lactate, arterial lactate levels.

*p<0.001 vs. Basal line

ANOVA one way

Table 3. Renal function over time between two groups.

	Basal Line	30' MV	120' MV
V_T8			
Inulin clear. (ml/min/100g BW)	0.80±0.05	0.67±0.05	0.72±0.03
Urinary output (ml/min)	0.015±0.002	0.022±0.07	0.014±0.03
FEH ₂ O (%)	0.36±0.05	0.37±0.04	0.29±0.03
FENa (%)	0.68±0.30	0.37±0.19	0.29±0.07
FEK (%)	35.02±5.44	23.63±3.81	21.32±4.41
V_T27			
Inulin clear. (ml/min/100g BW)	0.95±0.07	0.60±0.05*	0.40±0.04*†
Urinary output (ml/min)	0.017±0.002	0.025±0.011	0.012±0.001
FEH ₂ O (%)	0.76±0.27	0.87±0.24	0.59±0.05
FENa (%)	1.45±0.51	1.25±0.63	0.41±0.04
FEK (%)	50.77±15.74	26.68±8.58	19.61±1.60

MV, mechanical ventilation; FEH₂O, fraction of water excretion; FENa, fraction of sodium excretion; FEK, fraction of potassium excretion.

**p* < 0.01 vs basal; †*p* < 0.001 vs. basal.

ANOVA one-way

Figure 1. Inulin Clearance over the time in rats ventilated with 8ml/kg.

Figure 2. Inulin Clearance over the time in rats ventilated with 27ml/kg.

* $p < 0.01$ vs Control; † $p < 0.01$ vs 30' VM; ** $p < 0.01$ vs Control/30' VM