

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ASSOCIAÇÃO DA VENTILAÇÃO MECÂNICA E SEU DESMAME COM O
ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação de Mestrado

Cléber Verona

Porto Alegre, maio de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ASSOCIAÇÃO DA VENTILAÇÃO MECÂNICA E SEU DESMAME COM O
ESTRESSE OXIDATIVO

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aluno: Cléber Verona
Orientadora: Dra. Mara Silveira Benfato
Colaborador: Dr. Cassiano Teixeira

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estresse Oxidativo, do Departamento de Biofísica da UFRGS. Teve apoio do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE – HCPA) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | 7 |
| ABSTRACT | 9 |
| INTRODUÇÃO..... | 10 |
| ESTRESSE OXIDATIVO | 11 |
| VENTILAÇÃO MECÂNICA | 15 |
| DESMAME | 17 |
| PROTOCOLOS DE DESMAME..... | 22 |
| VENTILAÇÃO MECÂNICA, DESMAME E ESTRESSE OXIDATIVO | 23 |
| OBJETIVOS..... | 26 |
| OBJETIVO GERAL..... | 26 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| CAPÍTULO 1 | 27 |
| ARTIGO CIENTÍFICO | 27 |
| DISCUSSÃO..... | 48 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 56 |
| PERSPECTIVAS..... | 57 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |
| CURRICULUM VITAE | 63 |
| ANEXOS..... | 66 |

ABREVIATURAS

APACHE II: “*acute physiology and chronic health evaluation*”;

CAT: catalase;

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial;

EROs: espécies reativas de oxigênio;

ERNs: espécies reativas de nitrogênio;

FC: frequência cardíaca;

FiO₂: fração inspirada de oxigênio;

Fr: frequência respiratória;

GPx: glutathione peroxidase;

GSH: glutathione reduzida;

GSSG: glutathione oxidada;

HIF: fator induzido por hipóxia;

MDA: malondialdeído;

NOS: óxido nítrico sintase;

mrpm: movimentos respiratório por minuto;

PaCO₂: pressão parcial do gás carbônico arterial

PaO₂: pressão parcial de oxigênio arterial;

PAV: pneumonia associada à ventilação;

Peep: pressão expiratória final;

PIM: pressão inspiratória máxima;

Prx: peroxiredoxina;

SOD: superóxido dismutase;

SVCT: transportador de vitamina C sódio dependente;

TA: tensão arterial;

TE: tempo expiratório;

TI: tempo inspiratório;

TSR: terapia de substituição renal;

UTI: unidade de terapia intensiva;

VE: volume minuto;

VIDD: disfunção diafragmática induzida pelo ventilador;

VM: ventilação mecânica;

VT: volume de ar (*volume tidal*).

RESUMO

Título: Associação da ventilação mecânica e seu desmame com o estresse oxidativo.

Introdução: O estresse oxidativo é um dos processos envolvidos na disfunção da musculatura respiratória induzidas pela ventilação mecânica (VM), esta disfunção pode acarretar em dificuldades no desmame da ventilação destes pacientes. Estudos evidenciam que quanto maior o tempo de permanência de pacientes em VM, maior é a sua permanência em unidades de terapia intensiva (UTI), maior é a incidência de pneumonia associada a ventilação PAV, maiores são os gastos do sistema de saúde e maior é a mortalidade. Encontrar evidências de estresse oxidativo no sangue de pacientes submetidos à VM durante o teste de ventilação espontânea, poderá nos auxiliar no desenvolvimento de terapêuticas que reduzam o tempo de VM e suas complicações.

Objetivos: Analisar a influência da VM e seu desmame na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e nas defesas antioxidantes em sangue de pacientes.

Material e Métodos: As coletas iniciaram em março de 2009 e foram finalizadas em outubro de 2010. Os pacientes incluídos no estudo estavam internados na UTI do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e se encontravam em VM por tempo maior ou igual há 72 horas; foram excluídos os pacientes: menores de 18 anos idade; em suplementação de antioxidantes ou de ferro; que tivessem recebido transfusão sanguínea até 72h antes da coleta de dados, que tivessem diagnóstico de doenças oncológicas ou doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer); ou que não concordassem em fazer parte do estudo. Os pacientes foram submetidos à coleta de sangue venoso em três momentos: 1 - momento em que eram iniciados os testes de ventilação espontânea; 2 - momento em que o paciente apresentava falha no teste de ventilação espontânea, ou obtivesse sucesso; 3 - após 6 horas do sucesso ou falha no teste de ventilação espontânea. O estudo contemplou 34 pacientes subdivididos em dois grupos: os que obtiveram sucesso (n = 21) e os que apresentaram falha (n = 13). Os pacientes possuíam idade média de 65 anos de idade, 52% eram do sexo masculino, e estavam sob terapia de VM em média há 7,7 dias. Foram analisadas as defesas enzimáticas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) e as defesas não enzimáticas: glutathione total (GSSG), glutathione reduzida (GSH) e a quantificação de nitritos, nitratos e Vitamina C. Realizou-se também a mensuração de danos à proteínas (carbonilação) e em lipídeos através do malondialdeído (MDA).

Resultados: Verificou-se que 38% dos pacientes falharam no teste de ventilação espontânea. Este grupo, antes mesmo do início do teste, apresentava no plasma maior dano oxidativo em lipídeos (malondialdeído: 0.39 $\mu\text{mol/L}$ no grupo falha vs. 0.16 $\mu\text{mol/L}$ no grupo sucesso); maior concentração de antioxidante (Vitamina C: 1.78 $\mu\text{mol/L}$ no grupo falha vs. 0.81 $\mu\text{mol/L}$ no grupo sucesso); e diminuição na concentração de óxido nítrico (nitratos: 1.66 mmol NaNO₂/g proteína no grupo falha vs. 2.29 mmol NaNO₂/g proteína no grupo sucesso). As diferenças entre o grupo sucesso e falha mantiveram-se nos demais momentos (durante e após) o teste de ventilação espontânea.

Conclusão: Danos lipídicos elevados, quantidades aumentadas de vitamina C,

bem como baixas concentrações de óxido nítrico no plasma estão relacionados com a falha no desmame da ventilação mecânica.

Palavras-chave: estresse oxidativo; unidade de terapia intensiva, ventilação mecânica, desmame, malondialdeído, óxido nítrico, Vitamina C.

ABSTRACT

Title: Association of mechanical ventilation and its weaning to oxidative stress.

Introduction: Oxidative stress is one of the processes involved in respiratory muscle dysfunction induced by MV, this dysfunction can lead to difficulties in weaning from these patients. Studies show that the longer the duration of stay of patients on MV, the greater their ICU stay, the greater the incidence of PAV, the higher costs of health care and higher mortality. Finding evidence of oxidative stress in the blood of patients undergoing MV during spontaneous breathing test may assist us in the development of therapies that reduce the duration of mechanical ventilation and its complications.

Objective: Analyze the influence of mechanical ventilation and weaning in its production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidant defenses.

Material and Methods: The collection began in March 2009 and were completed in October 2010. Patients included in the study were admitted to the ICU of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre and in MV for time greater than or equal 72 hours ago, we excluded patients: children under 18 years old, in supplementation of antioxidants or iron, which had received blood transfusion within 72 hours prior to data collection, which had a diagnosis of oncological diseases and neurodegenerative diseases (Parkinson's and Alzheimer's), or who refused to join the study. Patients underwent venous blood was collected at three time points: 1 - the moment in which the tests were started spontaneous breathing; 2 - when the patient had failed spontaneous breathing trial, or were successfully; 3 - after 6 hours the success or failure of spontaneous breathing trial. The study included 34 patients divided into two groups: those who were successful (n = 21) and those that failed (n = 13). Patients had a mean age of 65 years old, 52% were male, and were under VM therapy for an average of 7.7 days. We analyzed the enzymatic defenses: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) and non-enzymatic defense: total glutathione (GSSG), reduced glutathione (GSH) and the measurement of nitrites, nitrates and Vitamin C. We also conducted to measure damage to proteins (carbonylation) and lipids as malonaldehyde (MDA).

Results: It was found that 38% of weaning failure. Before spontaneous breathing trial, these weaning failure patients already present, in the plasma, higher oxidative damage in lipids (malondialdehyde: 0.39 $\mu\text{mol/L}$ in weaning failure vs. 0.16 $\mu\text{mol/L}$ in weaning success); higher antioxidant level (Vitamin C: 1.78 $\mu\text{mol/L}$ in weaning failure vs. 0.81 $\mu\text{mol/L}$ in weaning success); and decreased nitric oxide concentration (nitrite: 1.66 mmol NaNO_2/g protein in weaning failure vs. 2.29 mmol NaNO_2/g protein in weaning success). The differences between weaning failure and weaning success patients remained during and after weaning trial.

Conclusion: Plasmatic higher lipid oxidative damage and higher Vitamin C as well as lower nitric oxide concentration are related to weaning failure from mechanical ventilation.

Keywords: oxidative stress; intensive care units; mechanical ventilation; weaning; malondialdehyde; nitric oxide; Vitamin C.

INTRODUÇÃO

Estresse Oxidativo

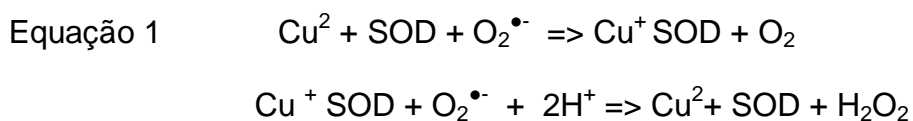
Espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser produzidas durante a redução de oxigênio molecular (O_2) à água (H_2O) na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Este processo metabólico utilizado por organismos aeróbicos é essencial para manutenção da vida, porém pode formar EROs tais como: o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroperoxila (HO_2^{\bullet}) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), sendo este último o mais reativo em sistemas biológicos, devido a sua facilidade em ligar-se a metais, outros radicais ou qualquer molécula biológica. A geração de EROs pode levar ao estresse oxidativo, contudo sabemos que EROs estão envolvidas em diversos processos biológicos como fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intra e intercelular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A produção de EROs, bem como espécies reativas de Nitrogênio (ERNs) e seus respectivos agentes antioxidantes em sistemas biológicos podem sofrer desequilíbrio levando o organismo ao estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Encontramos situações onde ocorrem a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e ácidos nucleicos devido ao aumento de espécies reativas ou redução de defesas antioxidantes. (SUZUKI *et al.*, 2006). Ao longo da evolução os organismos desenvolveram mecanismos de defesa que buscam manter o equilíbrio entre espécies reativas e antioxidantes. Os antioxidantes podem ser enzimáticos e não-enzimáticos, os não-enzimáticos por sua vez, podem ser de origem endógena ou exógena.

As superóxido dismutases (SOD), a catalase (CAT), as glutaciona

peroxidases (GPx) e as peroxirredoxinas (Prx) são as principais defesas antioxidantes enzimáticas. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

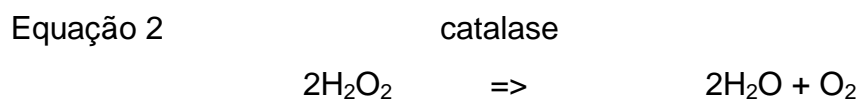
A SOD catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e água (Eq.1). Os mamíferos possuem três tipos de SOD, duas delas possuem cobre (Cu) em seu sítio ativo e uma possui manganês (Mn). Aquelas que possuem Cu no seu sítio ativo encontram-se uma intra e outra extracelular, enquanto que a SOD que possui Mn localiza-se na mitocôndria (FUKAI & USHIO-FUKAI, 2011).



A CAT juntamente com as Prx, possui a propriedade de reduzir peróxido de hidrogênio a água (Eq.2). A CAT localiza-se nos peroxissomos enquanto que as Prx localizam-se em diversos compartimentos celulares e são constituídas por uma família de seis diferentes antioxidantes (Prx1 à Prx6). As Prx convertem ainda peróxidos orgânicos em álcool, e peroxinitrito em nitrito (SHUVAEVA *et al.* 2009).

Nos mamíferos as Prx distribuem-se em diferentes compartimentos celulares. A Prx3 e Prx5 são direcionadas para a matriz mitocondrial, onde realizam a detoxificação do peróxido de hidrogênio produzido por esta organela. Pela abundância com que é encontrada, Prx3 é responsável por cerca de 90% da detoxificação do H₂O₂ na matriz mitocondrial (COX, *et al.*, 2010).

Os eritrócitos possuem as Prx1, Prx2 e Prx6 em seu interior, Prx2 é a mais abundante (sendo a terceira proteína mais abundante no interior do eritrócito) e atua na detoxificação de baixos níveis de H₂O₂. Duas possíveis importantes fontes de H₂O₂ na circulação são: H₂O₂ gerado na detoxificação do O₂^{•-} pela SOD, assim como o H₂O₂ gerado da auto-oxidação da hemoglobina (LOW *et al.*, 2008).



A GPx, possui um átomo de selênio (Se) em seu sítio ativo e atua na degradação de peróxidos no organismo (Eq. 3) (SINGH *et al.*, 2010).



A GPx degrada peróxidos oxidando duas moléculas de glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG), esta glutathione oxidada pode ser reduzida novamente pela enzima glutathione redutase (Eq. 4) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



Existem quatro formas de GPx: a GPx1 que é uma enzima citosólica; a

GPx2 que é encontrada no trato gastro intestinal e também é conhecida como GI-GPx; a GPx3 que é originada no rim e encontrada-se no plasma de mamíferos e também em diversos fluidos corporais, sendo a única que possui a propriedade de utilizar a tioredoxina como substrato, além de glutathione. Existe ainda a GPx4 que reduz não somente peróxidos orgânicos e H₂O₂ mas também hidroperóxidos de colesterol e ácidos graxos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A glutathione e o ácido úrico são exemplos importantes de defesas antioxidantes não-enzimáticas endógenas (VIÑA *et al.*, 2005).

A glutathione (GSH), é um oligopeptídeo endógeno, que além de ser substrato da GPx, também é o principal composto não-enzimático antioxidante intracelular, estando presente em concentrações semelhantes a da glicose em hepatócitos (VIÑA *et al.*, 1978). A GSH é um sequestrador de radicais livres em condições fisiológicas ou sob ação de xenobióticos, além de participar na regeneração dos antioxidantes ácido ascórbico e tocoferol.

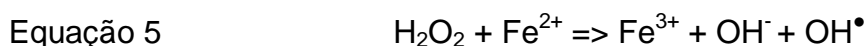
Existem importantes antioxidantes de origem exógena, como carotenóides, flavonóides, tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C).

A vitamina C tem importante papel como antioxidante. É um potente agente redutor e participa como cofator de vários processos de oxi-redução. Atua como sequestrador de EROs e ERNs, entre eles o O₂^{•-} e o HO[•]. Além disso, participa juntamente com o tocoferol na inibição da peroxidação lipídica (KOJO, 2004). Ela também desempenha um papel de coenzima em processos de oxidação, tais como hidroxilases e dioxigenases (DAVIES *et al.*, 1991).

A vitamina C ainda está envolvida no metabolismo de neurotransmissores, lipídeos e colágeno (KOJO, 2004). O ácido ascórbico

participa, juntamente com o Fe(II) na degradação de HIF (Fator de transcrição Induzível de Hipóxia) em situações de normóxia intracelular (MANDL *et al.*, 2009).

Cabe lembrar que o ácido ascórbico pode participar como agente redutor na redução do Fe(III) a Fe(II), resultante da reação de Fenton (Eq.5), em que o peróxido de hidrogênio reage com um metal de transição Fe(II) ou Cu⁺ formando dois hidróxidos, sendo um deles um radical e outro apenas um íon (KOJO, 2004).



Tão importante quanto as EROs e as defesas enzimáticas e não enzimáticas, estão as ERNs, que tem como exemplo o óxido nítrico (NO). O NO é uma molécula reativa de sinalização que interage como o oxigênio molecular e espécies reativas de oxigênio, tais como o superóxido (O₂^{•-}) para formar peroxinitrito (ONOO⁻), nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) (KELM, 1999). Os nitritos e nitratos podem indicar indiretamente a concentração de óxido nítrico de compartimentos biológicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O NO tem solubilidade limitada em meio aquoso, possui facilidade em atravessar membranas celulares e liga-se rapidamente a metais de transição como Cu, Mo e Fe, e quando incorporado por algumas enzimas pode afetar sua atividade. No sangue o óxido nítrico é rapidamente convertido a nitrato (SIERVO, 2011). O precursor de NO em sua biossíntese é a L-arginina um aminoácido semi-essencial que também está envolvido na síntese de proteínas, resposta imune e neurotransmissão (WU & MORRIS, 1998).

Os marcadores do dano em biomoléculas têm sido utilizados para inferir as consequências do estresse oxidativo. A mensuração de grupos carbonila é utilizada para inferir o dano oxidativo em proteínas. A carbonilação pode alterar a atividade de proteínas além de afetar o metabolismo e o transporte celular. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Produtos da peroxidação lipídica, tais como o malondialdeído, o 4-hidroxinonenal e o F(2)-isoprostanos são amplamente utilizados como marcadores de estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo*. A formação destes produtos ocorre quando EROs reagem com lipídios de membrana podendo causar alterações em sua estrutura e fluidez (MOORE & ROBERTS, 1998). Nos últimos 50 anos, a peroxidação lipídica tem sido objeto de estudos aprofundados devido ao seu envolvimento em doenças, processos de inibição, e sinalização de rotas biológicas. Hidroperóxidos lipídicos são formados como os principais produtos primários, mas também são substratos para diferentes enzimas que podem sofrer várias reações secundárias (YOSHIDA *et al.*, 2013).

Ventilação Mecânica

A ventilação mecânica (VM) ou, como seria mais adequado chamarmos, o suporte ventilatório, consiste em um método de suporte para o tratamento de pacientes com insuficiência respiratória aguda ou crônica agudizada. Tendo como objetivos: corrigir a hipoxemia e a acidose respiratória associada à hipercapnia; aliviar o trabalho elevado da musculatura respiratória em situações agudas de alta demanda metabólica; reverter ou evitar a fadiga da musculatura respiratória e diminuir o consumo de oxigênio. Desta forma, reduzindo o

desconforto respiratório; e permitindo a aplicação de terapêuticas específicas. Os critérios para aplicação de VM variam de acordo com os objetivos que se quer alcançar. Em situações de urgência, especialmente quando o risco de vida não permite boa avaliação da função respiratória, a impressão clínica é o ponto mais importante na indicação de VM, auxiliada por alguns parâmetros de laboratório. As principais indicações para iniciar o suporte ventilatório são: a reanimação devido à parada cardiorrespiratória; hipoventilação e apnéia; insuficiência respiratória devido a doença pulmonar intrínseca e hipoxemia; falência mecânica do aparelho respiratório; prevenção de complicações respiratórias e redução do trabalho muscular respiratório e fadiga muscular.

Resumindo, a VM é aplicada em várias situações clínicas em que o paciente desenvolve insuficiência respiratória, sendo, dessa forma, incapaz de manter valores adequados de O₂ e CO₂ sanguíneos (CARVALHO *et al.*, 2007).

A VM se faz através da utilização de aparelhos que, intermitentemente, insuflam as vias respiratórias com volumes de ar (VT). O movimento do gás para dentro dos pulmões ocorre devido à geração de um gradiente de pressão entre as vias aéreas superiores e o alvéolo, podendo ser conseguido por um equipamento que diminua a pressão alveolar (ventilação por pressão negativa) ou que aumente a pressão da via aérea proximal (ventilação por pressão positiva). Neste ar, controla-se a concentração de O₂ necessária para obter-se uma taxa arterial de oxigênio adequada. Controla-se ainda, a velocidade com que o ar será administrado e também se define a forma da onda de fluxo. O número de ciclos respiratórios que os pacientes realizam em um minuto (frequência respiratória) será consequência do tempo inspiratório (TI), que depende do fluxo, e do tempo expiratório (TE). O TE pode ser definido tanto

pelo paciente (ventilação assistida), de acordo com suas necessidades metabólicas, como através de programação prévia do aparelho (ventilação controlada). O produto da frequência respiratória pelo VT é o volume minuto (VE) (CARVALHO *et al.*, 2007).

A exposição de pacientes a procedimentos invasivos, como a intubação endotraqueal, bem como a manutenção destes, em ventilação mecânica os torna mais vulneráveis a infecções.

A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) é a infecção hospitalar mais comum nas unidades de terapia intensiva (UTI). A incidência da PAV é alta, podendo variar entre 6% e 52%, dependendo da população estudada, do tipo de UTI, e do tipo de critério diagnóstico utilizado, pois apesar de ser uma infecção extremamente importante, é um dos diagnósticos mais difíceis de ser estabelecido num paciente gravemente doente (TEIXEIRA, *et al.*, 2004). A mortalidade de pacientes com diagnóstico de PAV pode chegar a 50% (CHASTRE, *et al.*, 2002).

Indivíduos em VM prolongada (mais de 3 semanas de VM) representam 6% de todos os pacientes ventilados, porém consomem 37% dos recursos de uma UTI (WAGNER, 1989). Estima-se que o custo diário aproximado de um paciente em VM chegue a 2000 dólares americanos. (COOPER & LINDE-ZWIRBLE, 2004).

Desmame

O termo desmame refere-se ao processo de transição da ventilação artificial para a ventilação espontânea nos pacientes que permanecem em ventilação mecânica invasiva por tempo superior a 24 horas (CARVALHO *et al.*,

2007). Alguns autores relatam que o tempo gasto com o desmame da VM representa de 40 a 50% do tempo total de VM (ESTEBAN *et al.*, 2002).

O termo interrupção da VM refere-se aos pacientes que toleraram um teste de respiração espontânea e que podem ou não ser elegíveis para extubação. O teste de respiração espontânea (método de interrupção da ventilação mecânica) é a técnica mais simples, estando entre as mais eficazes para o desmame. É realizado permitindo-se que o paciente ventile espontaneamente através do tubo endotraqueal, conectado a uma peça em forma de “T”, com uma fonte enriquecida de oxigênio, ou recebendo pressão positiva contínua em vias aéreas (CPAP) de 5 cm H₂O, ou com ventilação com pressão de suporte (PSV) de até 7 cm H₂O (CARVALHO *et al.*, 2007).

Em fevereiro de 2007 European Respiratory Journal publicou o TASK FORCE – Weaning from mechanical ventilation, onde constam recomendações para a prática do desmame da ventilação. Participaram da construção desta publicação a European Respiratory Society (ERS), a American Thoracic Society (ATS), the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), e a Society of Critical Care Medicine (SCCM) e a Société de Réanimation de Langue Française (SRLF). Nela constam algumas considerações para a avaliação do teste de respiração espontânea, conforme consta na Tabela 1.

Tabela 1. Considerações para avaliação do teste de respiração espontânea

| | |
|----------------------------|---|
| Avaliação Clínica | <p><i>Tosse adequada</i></p> <p><i>Ausência de excessiva secreção traqueobronquica</i></p> <p><i>Resolução do distúrbio que levou o paciente a VM</i></p> |
| Variáveis Objetivas | <p><i>Estabilidade clínica</i></p> <p>Estabilidade cardiovascular (FC \leq 140 bpm; TA sistólica entre 90 - 160 mmHg; sem uso de vasopressor ou em doses baixas)</p> <p>Estabilidade metabólica</p> <p><i>Oxigenação adequada</i></p> <p>SaO₂ > 90% com FiO₂ < 0,4 ou (PaO₂/FiO₂ \geq 150 mmHg)</p> <p>Peep \leq 8 cmH₂O</p> <p><i>Função pulmonar adequada</i></p> <p>Fr \leq 35 mrpm</p> <p>PIM entre \leq -20 e -25 cm H₂O</p> <p>Ausência de significante acidose respiratória</p> <p><i>Estado neurológico</i></p> <p>Ausência de sedação ou em uso de sedativo sem alterações neurológicas</p> |

Tabela 1. Adaptado do TASK FORCE. (BOLES *et al.*, 2007).

O desmame pode ser classificado em: 1- simples: quando o paciente é extubado no primeiro teste de respiração espontânea (corresponde a 69% dos pacientes com uma mortalidade de 5%); 2- difícil: quando o paciente falha em até 3 testes de respiração espontânea ou até 7 dias após o primeiro teste de respiração espontânea; 3- prolongado: quando o paciente falha em 3 ou mais testes de respiração espontânea ou mais de 7 dias após o primeiro teste de respiração espontânea (o desmame difícil e prolongado correspondem juntos à 31% dos pacientes com uma mortalidade de 25%)(BOLES *et al.*, 2007).

A extubação é a retirada da via aérea artificial. No caso de pacientes traqueostomizados, utiliza-se o termo decanulação. Denomina-se reintubação ou fracasso de extubação, a necessidade de reinstaurar a via aérea artificial. A reintubação é considerada precoce quando ocorre em menos de 48 horas após a extubação (ou decanulação).

Define-se como sucesso da interrupção da ventilação mecânica como um teste de respiração espontânea que foi bem sucedido. Os pacientes que obtiverem sucesso no teste de respiração espontânea devem ser avaliados quanto à indicação de retirada da via aérea artificial (CARVALHO *et al.*, 2007).

A Tabela 2 indica algumas situações fisiológicas e patologias que podem impactar no desmame da ventilação:

Tabela 2. Alterações fisiológicas que podem contribuir para a falha do desmame

| Fisiopatologia | Considerar |
|--------------------------------|--|
| Capacidade respiratória | <p><i>Aumento do trabalho ventilatório:</i> ajuste inadequado do ventilador</p> <p><i>Redução da complacência:</i> pneumonia, edema pulmonar fibrose ou hemorragia pulmonar , infiltrado pulmonar difuso</p> <p><i>Broncoespasmo</i></p> <p><i>Aumento da resistência pulmonar</i></p> <p>Durante o teste de respiração espontânea: tubo endotraqueal</p> <p>Pós extubação: edema de glote, aumento da secreção em via aérea</p> |
| Capacidade cardíaca | <p><i>Doenças cardíacas prévias</i></p> <p><i>Aumento do trabalho cardíaco:</i> sepsis não resolvida, aumento das demandas metabólica</p> |
| Neuromuscular | <p><i>Depressão central do drive respiratório:</i> alcalose metabólica, uso de medicações sedativas</p> |
| Neuropsicológicas | <p><i>Delírio</i></p> <p><i>Ansiedade</i></p> <p><i>Depressão</i></p> |
| Metabólicas | <p><i>Distúrbios metabólicos</i></p> <p><i>Uso de corticóides</i></p> <p><i>Hiperglicemia</i></p> |
| Nutricionais | <p><i>Obesidade</i></p> <p><i>Desnutrição</i></p> |
| Anemia | |

Tabela 2. Adaptado do TASK FORCE. (BOLES *et al.*, 2007).

Acredita-se que a capacidade de iniciar o desmame nos pacientes em UTI seja subestimada visto que 50% dos pacientes que apresentam extubação não planejada (acidental) não necessitam retornar à VM (MION *et al.*, 2007).

Quando o paciente não tolera o teste de respiração espontânea, considera-se fracasso na interrupção da ventilação mecânica. No caso de fracasso da interrupção da ventilação mecânica, o paciente deverá receber suporte ventilatório que promova repouso da musculatura. Uma revisão das possíveis causas desse fracasso deverá ser feita pela equipe, bem como o planejamento da estratégia a ser adotada a seguir – nova tentativa de interrupção da ventilação mecânica ou desmame gradual (CARVALHO *et al.*, 2007).

Na Tabela 3 encontra-se as principais causas de falha no teste de respiração espontânea.

Tabela 3. Critérios de falha no teste de respiração espontânea

| | |
|---|--|
| Avaliação clínica e índices subjetivos | <p><i>Agitação e ansiedade</i></p> <p><i>Rebaixamento do sensorio</i></p> <p><i>Diaforese</i></p> <p><i>Cianose</i></p> <p><i>Evidência de aumento de esforço</i></p> <p><i>Aumento da utilização da musculatura acessória</i></p> <p><i>Face com sinais de desconforto</i></p> |
| Avaliação objetiva | <p><i>PaO₂ ≤ 50 – 60 mmHg com FiO₂ ≥ 0,5 ou SatO₂ < 90%</i></p> <p><i>PaCO₂ > 50 mmHg ou aumento da PaCO₂ > 8 mmHg</i></p> <p><i>pH < 7,32 ou decréscimo no pH ≥ 0,07</i></p> <p><i>Fr/VT > 105 mrpm x L-1</i></p> <p><i>Fr > 35 mrpm ou aumento ≥ 50%</i></p> <p><i>FC > 140 bpm ou aumento ≥ 20%</i></p> <p><i>TA sistólica > 180 mmHg ou aumento ≥ 20%</i></p> <p><i>TA sistólica < 90 mmHg</i></p> <p><i>Arritmias cardíacas</i></p> |

Tabela 3. Adaptado do TASK FORCE. (BOLES *et al.*, 2007).

Define-se sucesso do desmame a manutenção da ventilação espontânea durante pelo menos 48 horas após a interrupção da ventilação artificial. Considera-se fracasso ou falência do desmame, se o retorno à ventilação artificial for necessário neste período (CARVALHO *et al.*, 2007).

Protocolos de desmame

A instituição de protocolos de desmame, através da sistematização, pode reduzir o tempo de desmame da VM e de permanência na UTI (ELY *et al.*, 1996). Estudos randomizados e controlados comprovam que o empirismo aplicado ao desmame prolonga o tempo de ventilação mecânica (KOLLEF *et al.*, 1997).

Na maioria dos pacientes, após a recuperação do evento agudo que motivou a ventilação mecânica, o retorno gradual à ventilação espontânea pode ser abreviado. Cerca de 60% a 70% dos pacientes podem ser extubados após um breve teste em ventilação espontânea. A dificuldade no desmame reside em cerca de 5% a 30% dos pacientes, que não conseguem ser retirados do ventilador em uma primeira ou segunda tentativa (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os pacientes mesmo ao serem manejados sob diretrizes de protocolos de desmame para a extubação, muitas vezes não obtém êxito neste processo. Em um estudo realizado em Centros de Terapia Intensiva (CTI), de Porto Alegre, onde foram incluídos 458 pacientes em VM por mais de 48 horas, e submetidos ao protocolo de desmame, o qual avalia parâmetros ventilatórios, hemodinâmicos e gasométricos (anexo 1), demonstrou que 98 (21,4%) pacientes apresentaram falha no processo de extubação (VIEIRA *et al.*, 2008).

Ventilação Mecânica, Desmame e Estresse Oxidativo

Em modelo experimental animal realizado com ratos adultos, onde expuseram um grupo à ventilação mecânica (VM) por 12 horas e compararam ao grupo controle (não expostos), concluiu-se que a ventilação mecânica promove desequilíbrio das principais defesas antioxidantes do diafragma, contribuindo para o dano na musculatura inspiratória (FALK *et al.*, 2006).

Em outro estudo com ratos expostos à VM por 18 horas evidenciou-se diminuição de miofibrila muscular em todos os tipos de fibras diafragmáticas, além de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica (SHANELY *et al.*, 2002).

Outros pesquisadores verificaram que a VIDD pode estar relacionado ao estresse oxidativo mitocondrial (LECUONA *et al.*, 2012, PICARD *et al.*, 2012, POWERS *et al.*, 2012).

Em modelos experimentais com leitões expostos à VM por 3 horas ou 72 horas respectivamente, verificou que a pressão transdiafragmática, a força e frequência respiratória, foram reduzindo-se ao longo do tempo (RAMIREZ *et al.*, 2005).

A realização de necropsia em diafragma humano realizada em indivíduos expostos à VM, por período superior a 18 horas mostrou atrofia das miofibrilas diafragmáticas, além de diminuição dos níveis do antioxidante glutathione (LEVINE *et al.*, 2008).

Uma vez que, demonstrado em diversos estudos a ocorrência de dano oxidativo em modelos animais expostos à VM, alguns autores propuseram o uso de antioxidantes buscando revogar ou diminuir o dano oxidativo causado pela VM. O uso de N-acetilcisteína em cães submetidos à terapia ventilatória invasiva demonstrou diminuição significativa de danos oxidativos ao diafragma

(BARREIRO *et al.*, 2006). A glutathione é um tripeptídeo formado por glutamina, cisteína e glicina, a administração de algum destes substratos pode configurar em aumento dos níveis do produto, neste caso a glutathione (MONOSTORI *et al.*, 2009).

Outro estudo ainda com N-acetilcisteína em ratos sépticos demonstrou que o uso do antioxidante pode diminuir o estresse oxidativo levando a menor edema pulmonar no grupo tratado (CAMPOS *et al.*, 2012).

Verifica-se também, que o tratamento de ratos com o antioxidante Trolox atenua a disfunção diafragmática e a proteólise induzida por 12 horas de ventilação mecânica controlada (BETTERS *et al.*, 2004). Trolox é um potente sequestrador de radicais alcoxil e peroxil, que pode atuar tanto em meio aquoso como em meio lipossolúvel (ALBERTO *et al.*, 2013).

Em contrapartida, em um estudo recém publicado onde foi administrada glutamina a pacientes em VM e com falha orgânica múltipla encontrou-se aumento da mortalidade no grupo que recebeu o antioxidante (HEYLAND *et al.*, 2013).

Em pacientes com lesão pulmonar aguda observa-se desequilíbrio no estado redox causados por EROs e ERNs (REDDY *et al.*, 2007). Em outro estudo realizado em pacientes com lesão pulmonar aguda, onde se realizou coleta de fluído de edema, através de lavado broncoalveolar, logo após a intubação endotraqueal, mostrou diminuição dos níveis de antioxidantes como: ascorbato, urato, glutathione, nitrato e nitrito (BOWLER *et al.*, 2003).

Outros pesquisadores verificaram que ao ventilar-se o pulmão com volume de ar corrente excessivo, pode ocorrer aumento da permeabilidade alveolar e também na expressão de CuZnSOD e NOs pelos alvéolos. Além

disso, o uso de antioxidantes pode minimizar o dano oxidativo no tecido em questão (DAVIDOVICH, *et al.*, 2013).

Após a breve análise das publicações científicas apresentadas torna-se inegável a participação de EROs na disfunção diafragmática dos pacientes ventilados em UTI. Também é evidente o papel do estresse oxidativo nas diversas patologias dos pacientes criticamente enfermos. Os dados nos reportam a possível falha do processo de desmame associado ao dano diafragmático causado pelo ventilador.

Ao realizarmos a revisão de literatura não encontramos descrição de análise do estresse oxidativo em nível sanguíneo nos pacientes submetidos aos protocolos de desmame. É evidente a alteração no estado redox dos modelos animais submetidos à ventilação mecânica. Sabe-se do dano causado pela VM aos músculos respiratórios e trabalhos foram desenvolvidos e continuam sendo aplicados com antioxidantes utilizados como terapia para anular ou diminuir danos causados por EROs e ERNs.

Os protocolos de desmame apresentam desfechos favoráveis na condução da extubação. Avaliam os parâmetros gasométricos, ventilatórios e hemodinâmicos, porém apresentam número significativo de falhas. Talvez esteja envolvido algum dano sistêmico causado por EROs ou ERNs que possa ser detectado em nível sanguíneo, no processo de desmame ou apenas os músculos respiratórios são responsáveis pela falha?

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar a relação entre estresse oxidativo e o processo de desmame da ventilação mecânica.

Objetivos específicos

- I. Quantificar a atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) nos eritrócitos de pacientes submetidos ao processo de desmame;
- II. Verificar os níveis dos antioxidantes não enzimáticos: glutaciona, ácido ascórbico, uréia e nitritos e nitratos dos mesmos pacientes;
- III. Quantificar produtos de danos oxidativos em lipídios e proteínas nos pacientes submetidos ao processo de desmame;
- IV. Avaliar a associação do estresse oxidativo com falha ou sucesso do teste de respiração espontânea.

CAPÍTULO 1

Artigo Científico

Artigo submetido à revista *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.

Title: Can blood markers of oxidative stress predict weaning failure from mechanical ventilation?

Running title: Oxidative stress and weaning.

Authors

Cléber Verona¹; Fernanda Schäfer Hackenhaar¹; Cassiano Teixeira^{2,3}; Tássia Machado Medeiros¹; Paulo Vinicius Gil Alabarse¹; Tiago Boeira Salomon¹; Augusto Savi,²; Juçara Gasparetto Maccari²; Roselaine Pinheiro de Oliveira^{2,3}; Robledo Condessa⁴; Sérgio Pinto Ribeiro⁴; Mara Silveira Benfato^{1#}.

Affiliations

¹Biophysics Department, Program of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

² Department of Critical Care, *Moinhos de Vento* Hospital, Brazil

³Federal University of Health Sciences of Porto Alegre – UFCSPA Medical School, Brazil

⁴ *Clínicas* Hospital of Porto Alegre, Brazil

Corresponding author : Dr Mara Silveira Benfato, Departamento de

Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves,

9500, prédio 43422, room 204, Porto Alegre, RS, Brazil, 91501-970. Tel: (55-51)

33087603. Fax: (55-51) 33087003. Email mara.benfato@ufrgs.br

Running title: Oxidative stress and weaning

Classification: Critical Care ; 4.13 Ventilation: Non-Invasive/Long-Term/Weaning

¹ This study was funded by Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE – HCPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo e Pesquisa do Rio Grande do Sul (Fapergs).

Author's contributions:

Cléber Verona: manuscript preparation, oxidative stress assays, collection of patients data.

Fernanda Schäfer Hackenhaar: oxidative stress assays, collection of patients data.

Cassiano Teixeira: manuscript preparation, co-orientation.

Tássia Machado Medeiros: oxidative stress assays, collection of patients data.

Paulo Vinicius Gil Alabarse: oxidative stress assays.

Tiago Boeira Salomon: oxidative stress assays.

Augusto Savi: manuscript preparation, statistical tests.

Juçara Gasparetto Maccari: manuscript preparation.

Roselaine Pinheiro de Oliveira: manuscript preparation.

Robledo Condessa: collection of patients data.

Sérgio Pinto Ribeiro: manuscript preparation.

Mara Silveira Benfato: manuscript preparation, orientation.

Impact in research: The study suggests the oxidative stress biomarkers: malondialdehyde, Vitamin C and nitric oxide as possible predictors of weaning failure from mechanical ventilation.

Abstract

Rationale. Oxidative stress seems to be the key mechanism contributing to mechanical ventilation (MV)-induced respiratory muscle dysfunction, and it probably makes the weaning process difficult. The problem is that diagnosis depends on measurements in muscle diaphragmatic fiber.

Objective. To evaluate if respiratory muscle dysfunction, based on measurement of blood reactive species, is already present before- or is developed during weaning trial.

Methods. Prospective experimental study performed in MV-dependent patients \geq 72 hours submitted to the standard weaning protocol. Clinical, laboratorial and oxidative stress analyses were performed in three stages during the spontaneous breathing trial: immediately before the trial, at 30th minute of SBT in weaning success patients, or immediately before return to mechanical ventilation in weaning failure patients, and 6 hours after the end trial.

Measurements and main results. Thirty-four patients were included in the study with 38% of weaning failure. Before spontaneous breathing trial, these weaning failure patients already present higher oxidative damage in lipids (malondialdehyde: 0.39 $\mu\text{mol/L}$ in weaning failure vs. 0.16 $\mu\text{mol/L}$ in weaning success); higher antioxidant level (Vitamin C: 1.78 $\mu\text{mol/L}$ in weaning failure vs. 0.81 $\mu\text{mol/L}$ in weaning success); and decreased nitric oxide concentration (nitrite: 1.66 mmol NaNO_2/g protein in weaning failure vs. 2.29 mmol NaNO_2/g protein in weaning success). The differences between weaning failure and weaning success patients remained during and after weaning trial.

Conclusions. Plasmatic higher lipid oxidative damage and higher Vitamin C as well as lower nitric oxide concentration are related to weaning failure from mechanical ventilation.

Number of words: 246

Keywords: oxidative stress; intensive care units; weaning; mechanical

ventilation; malondialdehyde; nitric oxide; Vitamin C.

RATIONALE

The influence of free radicals on contractile function of skeletal muscles appears to be robust, common to muscles of the respiratory system and the limbs.¹ Both types of skeletal muscle constitutively generate free radicals and have comparable levels of antioxidant buffers.² In animals, diaphragmatic inactivity associated with mechanical ventilation (MV) leads to muscle fiber atrophy in the diaphragm and a reduction in its force-generating capacity.³⁻¹² Recently, authors^{13, 14} reported that prolonged diaphragmatic inactivity induced by MV in humans is associated with preferential fiber atrophy, and an increase in markers of proteolysis (E3 ubiquitin ligases, caspase-3, nuclear factor-kB, and calpains) within the diaphragm. Therefore, oxidative stress seems to be the key mechanism contributing to MV-induced respiratory muscle dysfunction (mainly diaphragmatic), and probably increases MV-time and makes the weaning process difficult.^{1, 2, 9}

Diaphragmatic function is a major determinant of the ability to successfully wean patients from MV.¹ Patients that fail in spontaneous breathing trial (SBT) show clinical manifestations of severe respiratory distress and, for years, observational studies¹⁵⁻¹⁸ have believed that weaning failure (WF) patients developed respiratory muscle fatigue by the time a failed weaning trial is stopped. However, Laguet *al.*¹⁹, who measured twitch transdiaphragmatic pressure (Pdi) using phrenic stimulation, failed to prove it, and showed that clinical manifestations of severe respiratory distress are evident before the patients are predicted to develop fatigue. Therefore, until now, there is evidence of muscle atrophy but there is no evidence concerning the development of respiratory muscle fatigue during SBT in patients who fail to wean.

In MV-subjects, Jaber *et al.*¹³ showed tissue atrophy and increased expression of ubiquitinated proteins, nuclear factor-kB, and calpain isoforms measured in diaphragmatic muscle, whilst Levine *et al.*¹⁴ found marked muscle atrophy and increased diaphragmatic proteolysis (reduced glutathione concentration and increased active caspase-3). Both authors made their measurements in muscle diaphragmatic fiber during MV-support. We do not know whether measures of oxidative stress in plasma spare patients from

muscle biopsies; and if they are related to weaning outcome. Therefore, the objectives of this study were to evaluate (a) if it is possible to demonstrate respiratory muscle dysfunction based on blood oxygen-derived or nitrogen-derived free radicals, and (b) if it is already present before- or is developed during SBT in WF patients.

METHODS

Study setting

This prospective experimental study was performed in a 44-bed mixed ICU of the *Clínicas* Hospital, a 795-bed tertiary referral hospital in the city of Porto Alegre, Brazil, and was approved by the Research Ethics Committees. All subjects or their surrogates provided written informed consent to participate in the study. The ICU staff physicians were blinded to the study design and measurements obtained, except for values of arterial blood gas.

Inclusion and exclusion criteria

MV-dependent patients ≥ 72 hours, who were submitted to the institutional weaning protocol, were included in the study. Exclusion criteria were: (a) refusing to sign the consent form, (b) patients using multivitamin or iron supplements, (c) neurodegenerative diseases (Parkinson's disease, Alzheimer syndrome, amyotrophic lateral sclerosis), and (d) tracheotomized patients.

Weaning protocol

All patients were ventilated with Servo (900C, Servo 300, I and S (Siemens-Elcoma AB, Solna, Sweden)). They were daily assessed for the presence of the following readiness-to-wean criteria: a) improvement in the underlying condition that leads to acute respiratory failure; b) adequate oxygenation, indicated by $\text{PaO}_2 \geq 60$ torr (≥ 8 kPa) on $\text{FiO}_2 \leq 0.4$ and positive end-expiratory pressure ≤ 8 cmH₂O; c) cardiovascular stability (heart rate ≤ 130 beats/min and no or minimal vasopressors); d) afebrile; e) adequate mental status (arousal, Glasgow Coma Scale score of ≥ 13 , and no continuous sedative infusions); f) effective cough; and (g) normal acid base and electrolytes.²⁰

Each patient was receiving pressure-support ventilation (PSV) at the time data collection commenced. Baseline recordings and blood samples were first obtained during 10 minutes of MV, and a trial of SBT was then initiated in patients meeting the above criteria. The patient was placed in a semi recumbent position and breathed through a T-tube circuit, receiving the same FiO_2 concentration as during MV. Intolerance to SBT was defined by: respiratory rate ≥ 35 breaths/min, oxygen saturation by pulse oximetry (SpO_2) $\leq 88\%$, heart rate ≥ 140 beats/min or changes $\geq 20\%$, change in mental status (drowsiness, coma, agitation, anxiety), diaphoresis, accessory muscle activity, or thoracoabdominal paradox. Patients who met these criteria were returned to MV and were designated as the failure group. Patients without these features at the end of the trial were extubated and were designated as the success group. Decisions for extubation or return to MV were made by ICU staff physicians, guided by institutional weaning protocol.

General ICU support

All Patients were managed in the same way; they were not subjected to any kind of differentiated clinical management. The feeding of patients was performed by nasoenteral tube, and the patients received a diet prescribed by the ICU nutrition support team. The amount of calories prescribed was 35-40 kcal/Kg/day; the amount of Vitamin C found in industrialized diets used was 42 mg/100 mL. Treatment of infections and renal dialysis (when needed) was the same in both groups. No patients received immunotherapy. During MV-period, the protocol for sedation was the same for both groups, with only two sedatives prescribed (fentanyl and midazolam).

Data collection

Collection of 10 mL of venous blood took place through a central venous catheter for laboratory and biochemical analyses at three times: (a) during MV-support, immediately before SBT, (b) at 30th minute of SBT in WS patients or immediately before patients' return to the MV in WF patients, and (c) 6 hours after the end of SBT. The samples were stored separately in four tubes (2 tubes with gel and 2 citrate tubes). One of the tubes with gel was sent to biochemistry for analysis. Samples from the remaining tubes were centrifuged, aliquoted and

frozen at -80°C for analysis of oxidative stress. Hemolysates were prepared by lysing red blood cells (RBC) with 2% ethanol (ratio 1:10) followed by centrifugation to obtain crude extracts. Ventilatory, hemodynamic, blood gas and biochemical analyses were further requested routinely to ICU patients and results were transcribed in their medical records.

Biochemical markers of injury

Evaluation of oxidative damage in proteins: Oxidative damage in proteins was measured in plasma by determining the carbonyl groups by a previously validated method.²¹ This technique quantifies the products of the reactions of reactive oxygen species with the side chains of amino acids (proline, arginine, lysine and threonine). The carbonylation can directly affect cellular metabolism and transport, as well as alter the activity of proteins. It lies between the reactive species of oxygen (ROS) and nitrogen (NOS) involved in this process (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , HO_2 , ONOO^- and complex iron-oxygen).²²

Evaluation of oxidative damage in lipids: The assessment of damage in lipids was analyzed in plasma by measuring malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation, which can occur when reactive oxygen species (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} and complex iron-oxygen) attack membrane lipids, or any other form of lipids found in the body. This reaction may cause changes in the structure and fluidity of membrane and solubility of this lipid.²² Quantification of MDA was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC)²³, gold standard technique for determination of lipid peroxidation.

Evaluation of enzymatic defenses: The defense enzymes in erythrocytes measured in this study were: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). CAT activity was determined with a spectrophotometer, where we monitored the disappearance of H_2O_2 at 240 nm by the Aebi method.²⁴ The SOD-activity was measured using RanSOD® kit (Randox, UK). Enzymatic kinetics of GPX was assessed by Ransel® Kit

(Randox, UK). The CAT and GPx enzymes act mainly by catalyzing the conversion of hydrogen peroxide into water and oxygen. The GPx turn also has the property of reducing other peroxides in alcohols. The SOD enzyme is a mechanism responsible for catalyzing the dismutation of superoxide radicals in two molecular oxygen and hydrogen peroxide. In this case, both superoxide radicals and hydrogen peroxide can cause damage to cellular compartments and organelles, causing changes in the physiological cell status, leading to cell death.²²

Evaluation of non-enzymatic defenses: The non-enzymatic defenses measured in this study were: total erythrocyteglutathione (tGSH) and still in their redox states, oxidized (GSSG) and reduced (GSH). Further, concentrations of Vitamin C were quantified in plasma, and nitrites and nitrates in both. The tGSH concentration was analyzed using the kit (glutathione assay® kit Cayman Chemicals, USA). To obtain the concentrations of reduced glutathione, vinylpyridine was necessary to include the samples and submit them to new experiments, using the same Kit. Glutathione is the major intracellular endogenous antioxidant, acts as a scavenger of reactive species, has action on the immune system and participates in the regulation of other antioxidants aiding the detoxification of xenobiotics.²² In humans, Vitamin C is an antioxidant obtained from a dietary intake. Ascorbate acts as a scavenger of ROS and NOS, among them ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot}). Furthermore, Vitamin C acts by inhibiting lipid peroxidation and then regenerating α -tocopherol in α -tocopheryl, among other functions.²²

Nitric oxide evaluation: Quantization of nitrates and nitrites was performed by spectrophotometric assay using the method of Grisham.²⁵ Nitrites and nitrates quantified indirectly indicate nitric oxide concentrations in samples. Nitric oxide can react with superoxide to form peroxynitrite, thereby preventing superoxide radicals from reacting with other radicals or attacking cellular components.²²

We also analyzed the iron status (serum transferrin saturation, serum ferritin, serum iron, and serum total iron-binding capacity [TIBC]), since the iron

bioavailability can alter the oxidative profile in patients. The uric acid dosage was also performed, because this compound is a known endogenous antioxidant.²²

Statistical analysis

Variables with normal distribution are presented as mean \pm SD, means being compared by Student's *t*-test. Variables with non-normal distribution are presented as median [25% - 75%], median being compared by Mann-Whitney test. A comparison of the variables over time in patients who achieved success or failure was performed by the method of generalized estimating equations (GEE). The GEE approach is adequate for the type of data analyzed here as it allows us to work with dependent measures (repeated measurements in the experimental units that are analyzed by the same professional in distinct moments). All analyses were performed at a 0.05 level of significance. A software package was used for all calculations (SPSS version 18.0.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Thirty-four patients were included in the study between March, 2009 and October, 2010. Weaning failure occurred in 38% of the patients for an average of 23 ± 16 minutes. Baseline characteristics of patients are showed in Table 1.

Before SBT, WF patients already present findings of damage in lipids (MDA in WF: $0.39\ \mu\text{mol/L}$ [0.14-0.80] vs. MDA in WS: $0.16\ \mu\text{mol/L}$ [0.06-0.39] (Figure 1A); higher antioxidant level (Vitamin C in WF: $1.78\ \mu\text{mol/L}$ [0.52-10.85] vs. Vitamin C in WS: $0.81\ \mu\text{mol/L}$ [0.26-1.20] (Figure 1B); decreased nitric oxide concentration (nitrite in WF: $1.66\ \text{mmol NaNO}_2/\text{g protein}$ [0.87-6.46] vs. nitrite in WS: $2.29\ \text{mmol NaNO}_2/\text{g protein}$ [1.11-4.27] (Figure 1C). The differences between WS and WF patients remained during and after weaning trial.

Evaluations of enzymatic (SOD, CAT, and GPx), and other non-enzymatic defenses (erythrocyte tGSH, GSSG, GSH, erythrocyte nitrite and nitrate, and plasmatic uric acid), as well as of damage in plasmatic proteins (carbonyl groups) and iron status were similar in WS and WF patients. Table 2 presents the data for blood biomarkers.

DISCUSSION

Oxidative stress seems to be the key mechanism contributing to MV-induced respiratory muscle dysfunction, and our data showed that it probably makes the weaning process difficult.

Weaning from MV covers the entire process of liberating the patient from mechanical support and from the endotracheal tube, and the management of these patients is particularly difficult, largely because of limited understanding of the pathophysiologic mechanisms responsible for WF.²⁶ Jubran *et al.*¹⁷ showed that inspiratory muscle effort is markedly increased in patients who fail a weaning trial, and the associated increase in intrathoracic pressure excursions may lead to complex cardiopulmonary interactions as demonstrated by Lemaire *et al.*²⁷, who documented sudden increases in pulmonary artery occlusion pressure during unsuccessful weaning attempts.

Regarding the study of muscle fibers, a major contributor to the failure of weaning seems to be the development of respiratory muscle fatigue.²⁸ Most studies suggest that the major factors underlying neuromuscular fatigue occur within the muscle fibers and mainly result from depletion of muscle energy stores or pH changes from lactate accumulation.^{29, 30} Recently, oxygen-derived free radicals have been implicated as mediators of diaphragm muscle dysfunction; however, the precise source of free radicals, the particular physiological conditions under which they can be generated, and the protective mechanism of different free radical scavengers in the respiratory muscles remain unclear.^{31, 32} Another problem for weaning is the early development of ventilator-induced diaphragmatic dysfunction (VIDD) in patients submitted to a MV.^{1, 13, 14, 33} Previous studies^{13, 14, 34}, performed on the diaphragms of critically ill patients receiving MV, have found increase in oxidative stress, muscle fiber atrophy and injury, as well as the activation of several major proteolytic pathways (ubiquitin-proteasome, caspases, calpains) and an important degree of upregulation of the lysosomal-mediated autophagy pathway in the diaphragm during MV. Plasma oxidative stress measures of our patients retained the same behavioral differences between WF and WS during SBT. This may suggest that

there was no development of respiratory muscle fatigue during the trial. However, the differences in the pre-SBT level of NO, MDA and Vitamin C found in patients with WF compared to WS may suggest a predisposition to fail the weaning test related to the development of VIDD. That is, the SBT only confirmed and showed the weakness of respiratory muscles already established and probably associated with the time dependence on MV.

All our patients had very low levels of Vitamin C, and this finding corroborates the current knowledge about plasma trace elements and vitamins in critically ill patients.³⁵ Previous data of our research group, using the same measurement technique, showed that outpatients had Vitamin C levels 3 times higher than those shown in this study.³⁶ Nutritional support for critically ill patients is often suboptimal, due to problems with both nutrient prescription and delivery, and studies on nutrition in critically ill patients have not yet defined the calorie target for these individuals. It is also known that patients receive lesser amounts of food due to diet breaks for the implementation of procedures and routine exams. There are still those clinical situations where the patient's gastrointestinal tract is unable to digest or absorb food administered.³⁷ Added to this, the bioavailability of ascorbic acid is decreased both in patients receiving enteral and parenteral Vitamin C.³⁵ Importantly, our patients received the same therapeutic target enteral nutrition, including Vitamin C doses of 42 mg/100mL in the diet³⁸, and the rate of patients on renal replacement therapy was the same in both groups. The difference in ascorbic acid in the groups success and failure is not due to renal reabsorption, since in both groups there were patients with normal renal function and other arrangements in Renal Replacement Therapy (TSR). And when we compare the vitamin C levels of patients who were under the regime of TSR, continuous or intermittent versus patients with normal renal function, no differences were found between groups ($p = 0.675$) in the levels of vitamin C (data not shown). Also, when matched with iron metabolism data (Vitamin C participate in the degradation of Hypoxia-Inducible transcription factor) in situations of intracellular normoxia) no differences were found.³⁹

In our sample, WF patients had Vitamin C level higher than WS patients. We believe that these patients were not "consuming" the Vitamin C due to down-regulation of Vitamin C transporters (Sodium-dependent Vitamin C

Transporter [SVCT]) as seen in cardiomyocytes from rats exposed to doxorubicin.⁴⁰ It is important to remember that animal models (mice, rats and pigs) have the ability to synthesize ascorbic acid, unlike humans who lack the ability to synthesize Vitamin C due to absence of the enzyme gulonolactone oxidase.³⁹

Nitric oxide has a multiple, important physiological role. For example, NO synthesized by the vascular endothelial cells that line the interior of blood vessels presumably diffuses in all directions, but some of it will reach the underlying smooth muscle. As a result the muscle relaxes, dilating the vessel and lowering the blood pressure.² A way to measure the NO levels is to examine end-products of NO, the most common being nitrites. It has been suggested that plasma levels of nitrite in humans are a measure of vascular endothelial NO synthesis. However, nitrite is quickly oxidized to nitrate *in vivo*. In the skeletal muscle of rats was founded that inhibition of NO production by systemic application of L-NG-Nitroarginine Methyl Ester(L-NAME) induced partial hypoxia already under resting conditions.⁴¹ Therefore, it seems plausible that the robust 'remaining vasodilatation', which was found to be insensitive to additional inhibitors, is due to muscle hypoxia rather than to exercise-induced release of activity signals.⁴² We believe that this is the explanation why nitrites and nitrates are higher in WS patients before weaning trial and have not changed during weaning trial in both groups. Nitrites and nitrates can be absorbed from the diet.²² As the patients in this study received an enteral industrialized diet, we believe that the measurement of NO by this technique is reliable.

Animal models receiving MV-support have increased lipid peroxidation^{8, 12, 43} and antioxidant administration may have decreased it.⁴⁴ Our data showed that WF patients have more lipid peroxidation, based on higher MDA levels when comparing with WS patients in three measurements. Similar lipid profile was present in both groups, except for triglycerides. Triglyceride levels were also higher in WF patients, and it could lead to a bias in interpreting the results of MDA. However, there was an inverse relationship between these findings; patients with higher level of triglycerides have smaller lipid peroxidation. Furthermore, we do not know whether this finding of MDA represents specific damage in diaphragmatic muscle cells, since our data were collected in plasma.

However, the main finding was the positive relationship between lipid damage and failure to wean from MV.

Our study had a number of limitations. First, the sample size could be too small to detect the real difference between the groups. Second, this is an observational study and, therefore, the results cannot be used to modify clinical practice. However, no study has used blood measurements of oxidative stress predicting weaning from MV; furthermore, we believe that plasma assay is appropriate in this case because it provides a systemic evaluation, not only diaphragmatic, of oxidative status.

In conclusion, higher lipid oxidative damage (MDA), higher Vitamin C and lower nitric oxide concentration in plasma were related to weaning failure from mechanical ventilation even before SBT, in this sample. More studies are necessary to prove the relationship between plasma biomarkers of oxidative damage and an interventional study should be performed to include these measurements in clinical practice.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the support of Hospital de Clinicas de Porto Alegre and Grupo Hospitalar Conceição, in providing facilities for sample collection, and Dr. I. Vaz for generously providing equipment, also Dr. D. Bonato for reviewing services.

References

1. Jaber S, Jung B, Matecki S, Petrof BJ. Clinical review: ventilator-induced diaphragmatic dysfunction--human studies confirm animal model findings! *Critical care (London, England)* 2011;15(2):206.
2. Smith MA, Reid MB. Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. *Respiratory physiology & neurobiology* 2006;151(2-3):229-41.
3. Le Bourdelles G, Viires N, Boczkowski J, Seta N, Pavlovic D, Aubier M. Effects of mechanical ventilation on diaphragmatic contractile properties in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(6):1539-44.
4. Powers SK, Shanely RA, Coombes JS, et al. Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm. *J Appl Physiol* 2002;92(5):1851-8.
5. Radell PJ, Remahl S, Nichols DG, Eriksson LI. Effects of prolonged mechanical ventilation and inactivity on piglet diaphragm function. *Intensive Care Med* 2002;28(3):358-64.
6. Criswell DS, Shanely RA, Betters JJ, et al. Cumulative effects of aging and mechanical ventilation on in vitro diaphragm function. *Chest* 2003;124(6):2302-8.
7. Gayan-Ramirez G, de Paepe K, Cadot P, Decramer M. Detrimental effects of short-term mechanical ventilation on diaphragm function and IGF-I mRNA in rats. *Intensive Care Med* 2003;29(5):825-33.
8. Jaber S, Sebbane M, Koechlin C, et al. Effects of short vs. prolonged mechanical ventilation on antioxidant systems in piglet diaphragm. *Intensive Care Med* 2005;31(10):1427-33.
9. Kevin LG. Comment on "Effects of short vs. prolonged mechanical ventilation on antioxidant systems in piglet diaphragm" by Jaber et al. *Intensive Care Med* 2006;32(9):1446; author reply 7.
10. Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, Bruells CS, Levine S, Powers SK. Both high level pressure support ventilation and controlled mechanical ventilation induce diaphragm dysfunction and atrophy. *Crit Care Med* 2012;40(4):1254-60.
11. Smuder AJ, Hudson MB, Nelson WB, Kavazis AN, Powers SK. Nuclear factor-kappaB signaling contributes to mechanical ventilation-induced diaphragm weakness*. *Crit Care Med* 2012;40(3):927-34.
12. Kavazis AN, Talbert EE, Smuder AJ, Hudson MB, Nelson WB, Powers SK. Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free radical biology & medicine* 2009;46(6):842-50.
13. Jaber S, Petrof BJ, Jung B, et al. Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(3):364-71.
14. Levine S, Nguyen T, Taylor N, et al. Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *The New England journal of medicine* 2008;358(13):1327-35.
15. Cohen C, Zigelbaum G, Gross D, Roussos C, PT PM. Clinical manifestations of inspiratory muscle fatigue. *Am J Med* 1982;73(3):308-16.
16. Vassilakopoulos T, Zakynthinos S, Roussos C. The tension-time index and the frequency/tidal volume ratio are the major pathophysiologic determinants of weaning failure and success. *Am J Respir Crit Care Med*

1998;158(2):378-85.

17. Jubran A, Tobin M. Pathophysiologic basis of acute respiratory distress in patients who fail a trial of weaning from mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(3):906-15.

18. Capdevila X, Perrigault P, Ramonatxo M, et al. Changes in breathing pattern and respiratory muscle performance parameters during difficult weaning. *Crit Care Med* 1998;26(1):79-87.

19. Laghi F, Cattapan S, Jubran A, et al. Is weaning failure caused by low-frequency fatigue of the diaphragm? *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(2):120-7.

20. Boles JM, Bion J, Connors A, et al. Weaning from mechanical ventilation. *Eur Respir J* 2007;29(5):1033-56.

21. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radical biology & medicine* 2002;32(9):790-6.

22. Halliwell B, JMC. G. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4rd ed. New York: Oxford University Press; 2007.

23. Karatepe M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LCGC North American Magazine* 2004;22:326-65.

24. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 1984;105:121-6.

25. Grisham M, Johnson G, Lancaster JJ. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods in enzymology* 1996;268:237-46.

26. Tobin MJ, Jubran A. Weaning from mechanical ventilation. In: Tobin MJ, ed. *Principles & practice of mechanical ventilation*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2006:1185-220.

27. Lemaire F, Teboul J, Cinotti L, et al. Acute left ventricular dysfunction during unsuccessful weaning from mechanical ventilation. *Anesthesiology* 1988;69(2):171-9.

28. NHLBI Workshop summary. Respiratory muscle fatigue. Report of the Respiratory Muscle Fatigue Workshop Group. *Am Rev Respir Dis* 1990;142(2):474-80.

29. Vassilakopoulos T, Zakynthinos S, Roussos C. Muscle function. In: Marini JJ, Slutsky AS, eds. *Physiological basis of ventilatory support*. New York: Marcel Dekker; 1998:102-52.

30. Westerblad H, Allen D. Changes of myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibers. *J Gen Physiol* 1991;98(3):615-35.

31. Anzueto A, Supinski G, Levine S, Jenkinson S. Mechanisms of disease: are oxygen-derived free radicals involved in diaphragmatic dysfunction? *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(4 Pt 1):1048-52.

32. Shindoh C, DiMarco A, Thomas A, Manubay P, Supinski G. Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue. *J Appl Physiol* 1990;68(5):2107-13.

33. Doorduyn J, van Hees HW, van der Hoeven JG, Heunks LM. Monitoring of the respiratory muscles in the critically ill. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013;187(1):20-7.

34. Hussain SN, Mofarrahi M, Sigala I, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragm disuse in humans triggers autophagy. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182(11):1377-86.

35. Shenkin A. Basics in clinical nutrition: trace elements and vitamins in parenteral and enteral nutrition. *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* 2008;3(3):e293-7.

36. Klein C, Martinez D, Hackenhaar FS, et al. Carbonyl groups: Bridging the gap between sleep disordered breathing and coronary artery disease. *Free radical research* 2010;44(8):907-12.
37. Singh N, Gupta D, Aggarwal AN, Agarwal R, Jindal SK. An assessment of nutritional support to critically ill patients and its correlation with outcomes in a respiratory intensive care unit. *Respiratory care* 2009;54(12):1688-96.
38. Pontes-Arruda A, Aragao AM, Albuquerque JD. Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock. *Critical care medicine* 2006;34(9):2325-33.
39. Mandl J, Szarka A, Banhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British journal of pharmacology* 2009;157(7):1097-110.
40. Ludke AR, Sharma AK, Akolkar G, Bajpai G, Singal PK. Downregulation of vitamin C transporter SVCT-2 in doxorubicin-induced cardiomyocyte injury. *American journal of physiology* 2012;303(6):C645-53.
41. Pohl U, Wagner K, de Wit C. Endothelium-derived nitric oxide in the control of tissue perfusion and oxygen supply: physiological and pathophysiological implications. *European heart journal* 1993;14 Suppl I:93-8.
42. Whyte JJ, Laughlin MH. The effects of acute and chronic exercise on the vasculature. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2010;199(4):441-50.
43. Maes K, Testelmans D, Cadot P, et al. Effects of acute administration of corticosteroids during mechanical ventilation on rat diaphragm. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008;178(12):1219-26.
44. Whidden MA, McClung JM, Falk DJ, et al. Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *J Appl Physiol* 2009;106(2):385-94.

Table 1. Baseline characteristics

| Characteristics | Weaning success (n = 21) | Weaning failure (n = 13) |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| Age, years | 63 ± 15 | 66 ± 16 |
| Male sex – n (%) | 12 (57) | 6 (46) |
| APACHE II score* | 23 ± 8 | 29 ± 12 |
| Cause of acute respiratory failure – n (%) | | |
| Cardiogenic pulmonary edema | 1 (4.8) | 2 (15.4) |
| Stroke | 8 (38.1) | 2 (15.4) |
| Postoperative | 3 (14.3) | 3 (23.0) |
| ARDS | 7 (33.3) | 6 (46.0) |
| Cardiorespiratory arrest | 2 (9.5) | — |
| Comorbidities – n (%) | | |
| AIDS | 2 (9.5) | — |
| Diabetes | 3 (14.3) | 3 (23.1) |
| End-stage chronic renal failure | 4 (19.0) | 2 (15.4) |
| Hypertension | 9 (42.9) | 9 (69.2) |
| Ischemic heart disease | 3 (14.3) | 2 (15.4) |
| Cirrhosis | 3 (14.3) | 1 (7.7) |
| Cancer | 1 (14.8) | — |
| Arterial gas parameters | | |
| pH | 7.46 ± 0.064 | 7.46 ± 0.074 |
| pO ₂ , mmHg | 130 ± 32 | 127 ± 49 |
| pCO ₂ , mmHg | 36.6 ± 6.0 | 36.3 ± 8.4 |
| Days on MV before weaning trial | 6.8 ± 3.7 | 8.6 ± 8.5 |
| Failure time with trial T, minutes | — | 23 ± 16 |
| Biochemical results | | |
| Hemoglobin, g/dL | 9.23 ± 2.13 | 8.86 ± 1.87 |
| Leukocyte count, x10 ³ /μL | 11.84 ± 6.43 | 11.16 ± 4.78 |
| Glucose, mg/dL | 116 ± 26.90 | 130.85 ± 37.71 |
| Triglycerides, mg/dL* | 157.95 ± 86.17 | 111.08 ± 44.19 |
| Total cholesterol, mg/dL | 129.19 ± 44.43 | 127.08 ± 40.92 |
| HDL cholesterol, mg/dL | 23.38 ± 10.17 | 30.15 ± 18.85 |
| C-reactive protein, mg/dL | 92.26 ± 70.31 | 109.47 ± 69.42 |
| Uric acid, mg/dL | 3.14 ± 1.37 | 4.00 ± 1.76 |
| Transferrin saturation, % | 28.74 ± 15.70 | 27.14 ± 17.91 |
| Ferritin, ng/mL | 1141.68 ± 1337.86 | 1193.58 ± 2095.20 |
| Iron, μg/dL | 49.81 ± 30.68 | 45.23 ± 30.07 |
| Total iron binding capacity, mg/dL | 180.29 ± 59.70 | 172.15 ± 63.63 |

Data are given as mean ± SD unless otherwise noted.

Definition of abbreviations: APACHE = Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; ARDS = Acute respiratory distress syndrome; AIDS = acquired immunodeficiency disease syndrome; MV = mechanical ventilation.

*p ≤ 0.05 (difference between the success and failure).

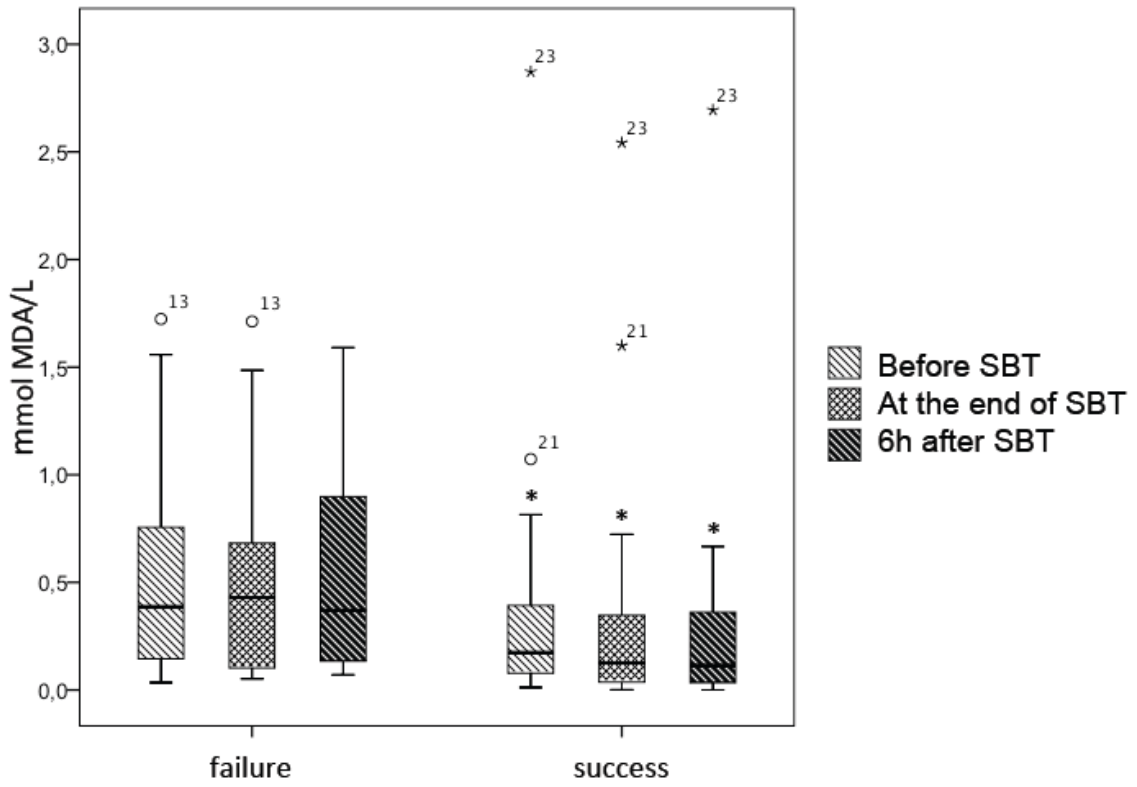
Table 2: Blood biomarkers.

| | Weaning success | | | Weaning failure | | |
|--|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | (n = 21) | | | (n = 13) | | |
| | Before SBT | End SBT | 6h after SBT | Before SBT | End SBT | 6h after SBT |
| Damage | | | | | | |
| Plasma Carbonyl, nmol carbonyl/g prot | 0.23(0.15 0.33) | 0.19(0.15 0.24) | 0.20(0.12 0.24) | 0.25(0.15 0.41) | 0.23(0.15 0.37) | 0.18(0.12 0.28) |
| Serum MDA, $\mu\text{mol/L}^*$ | 0.16(0.06 0.39) | 0.13(0.03 0.35) | 0.11(0.03 0.37) | 0.39(0.14 0.80) | 0.43(0.10 0.72) | 0.37(0.12 0.90) |
| Enzymatic defenses | | | | | | |
| Erythrocytes CAT, U/g Hb | 84612(55977 10071) | 82911(64086 108658) | 79063(66444 98232) | 74865(58543 106417) | 87109(60940 114355) | 78922(57487 101927) |
| Erythrocytes SOD, U/g Hb | 5.11(4.50 6.45) | 5.38(4.34 6.20) | 5.45(4.37 6.44) | 5.80(4.72 6.35) | 5.53(4.83 6.10) | 5.62(4.76 6.05) |
| Erythrocytes GPx, U/g Hb | 7.49(4.81 12.0) | 7.23(5.11 13.66) | 7.49(5.17 11.65) | 8.36(6.74 12.3) | 9.95(7.60 11.42) | 8.59(6.48 12.9) |
| Non- enzymatic defenses | | | | | | |
| Erythrocytes GSH, $\mu\text{mol/g Hb}$ | 5.25(3.08 9.03) | 6.32(4.45 8.84) | 6.34(4.03 8.31) | 5.46(4.07 8.38) | 5.45(3.29 8.09) | 6.38(4.23 7.73) |
| Erythrocytes GSSG, $\mu\text{mol/g Hb}$ | 7.08(5.85 8.34) | 7.37(6.49 8.93) | 6.78(6.19 9.07) | 7.90(6.90 8.80) | 7.68(6.23 9.61) | 7.64(6.14 9.18) |
| Erythrocytes GSH t, $\mu\text{mol/g Hb}$ | 13.44(10.57 14.81) | 15.16(11.24 16.74) | 14.88(9.94 16.31) | 13.95(11.30 15.67) | 13.96(12.28 16.26) | 14.21(10.95 15.78) |
| Serum Vitamin C, $\mu\text{mol/L}^*$ | 0.81(0.26 1.20) | 0.61(0.22 1.50) | 0.60(0.20 1.20) | 1.78(0.52 10.85) | 1.88(0.49 10.04) | 1.95(0.65 8.34) |
| Plasma Nit, mmol $\text{NaNO}_2/\text{g prot}^*$ | 2.29(1.11 4.27) | 2.06(1.05 3.99) | 2.69(1.14 5.08) | 1.66(0.87 6.46) | 1.51(0.77 6.42) | 1.86(1.07 6.49) |
| Erythrocytes Nit, mmol $\text{NaNO}_2/\text{g Hb}$ | 80.80(65.72 93.69) | 84.68(66.23 100.28) | 82.19(70.65 95.81) | 80.52(61.65 96.29) | 81.78(72.67 90.56) | 83.24(65.17 98.46) |

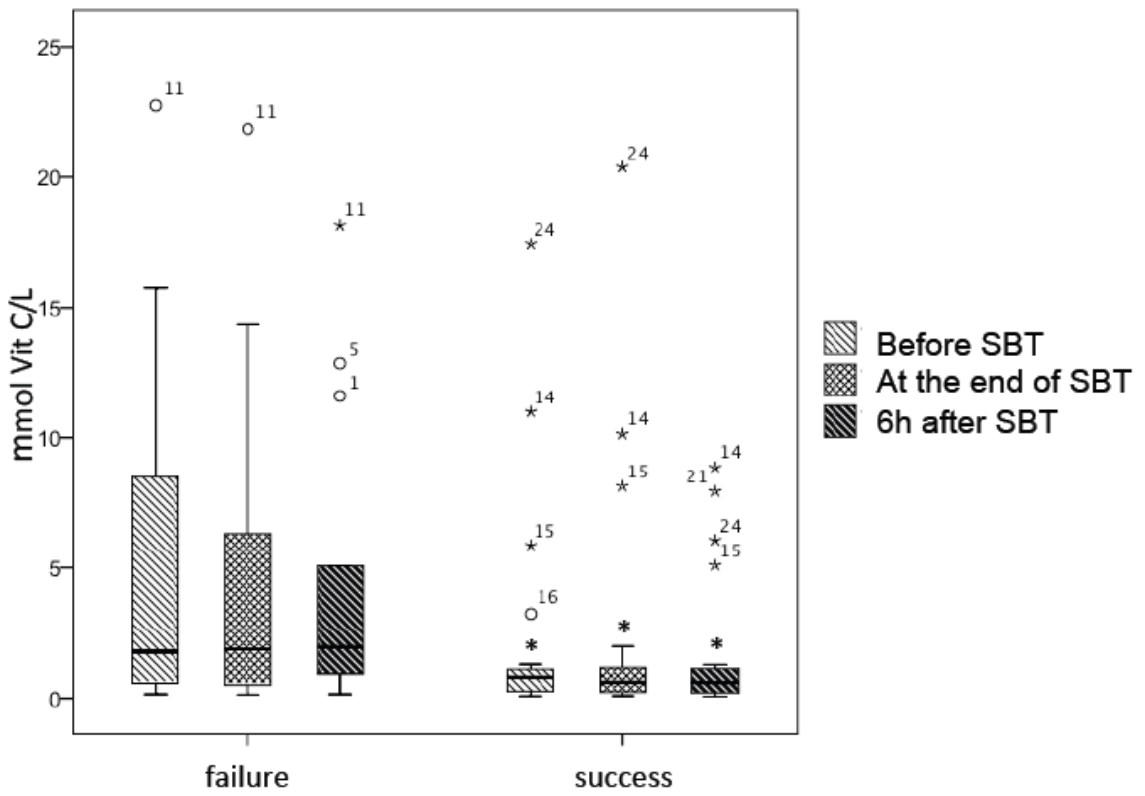
Data are given as median (percentiles 25|75)

* $p \leq 0.05$ difference between success and failure groups).

A



B



C

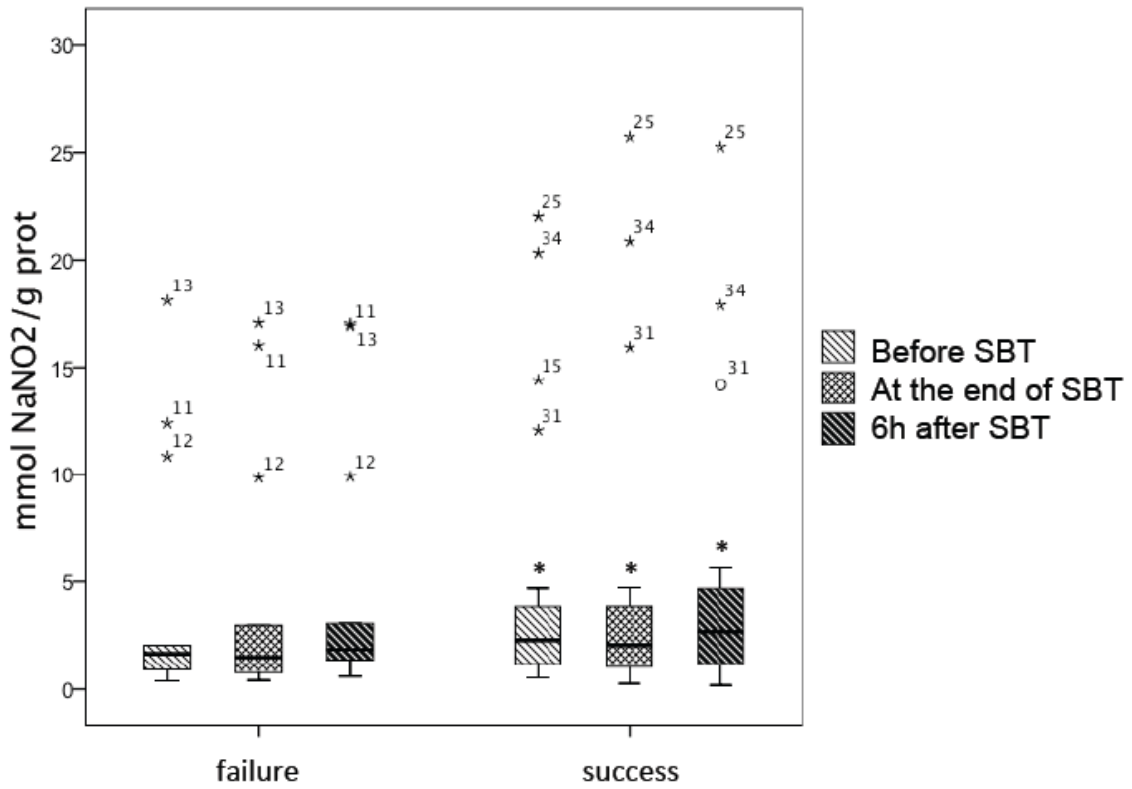


Figure 1. Changes in blood biomarkers before spontaneous breathing trial SBT, at the end of SBT and 6h after SBT.(A) sereum MDA; (B) serum vitamin C; and (C) plasma nit * $p \leq 0,05$ comparing weaning success and failure.

Definition of abbreviations:MDA, malondialdehyde; SBT, spontaneous brathing trial; nit, nitrites and nitrates.

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no trabalho evidenciam que pacientes submetidos à VM apresentam alterações oxidativas em nível sanguíneo. Inúmeros trabalhos com modelos humanos e cobaias de laboratório, verificaram a ocorrência de dano oxidativo no músculo diafragmático, sendo este o principal causador da falha no teste de ventilação espontânea, e por sua vez, no desmame da ventilação. Contudo não se encontra na literatura trabalhos que relacionem estresse oxidativo com VM em tecido sanguíneo.

É evidente que pacientes criticamente enfermos apresentem alterações de defesas antioxidantes, bem como a presença de marcadores de dano oxidativo (GRUNE & BERGER, 2007). Os pacientes deste estudo de ambos os grupos apresentavam estresse oxidativo, devido a suas patologias de base, sua resposta imunológica e também pelo tratamento empregado (GRUNE & BERGER, 2007).

Observamos a semelhança entre os dois grupos, apesar do estudo não tratar-se de um ensaio randomizado. Conforme observado na Tabela 1 do artigo científico verifica-se que os grupos diferem apenas nas variáveis triglicéridos (já discutido no artigo científico) e APACHE II .

O APACHE II é um escore aplicado à pacientes de UTI que avalia variáveis fisiológicas nas primeiras 24 horas de internação capaz de predizer gravidade e risco de morte onde ambos são diretamente proporcionais ao resultado numérico encontrado no escore (KNAUS *et al.*, 1985). Nossos pacientes obtiveram um resultado que prediz uma mortalidade aproximada entre 24 e 73% no grupo sucesso e 24 e 85% no grupo falha. Encontramos uma correlação negativa entre o sucesso no desmame e escore do APACHE ($r = - 0,452$; $p = 0,012$). Sendo que

quanto maior o escore obtido menor as chances de obter êxito no teste de ventilação espontânea. Contudo não podemos afirmar que quanto maior o APACHE maior será o estresse oxidativo nos pacientes do estudo, uma vez que não encontramos em nossos achados correlações positivas entre APACHE e medidas de dano ou defesas antioxidantes (dados não apresentados).

Ao verificarmos os níveis plasmáticos de vitamina C nos pacientes do estudo encontramos um déficit desta vitamina em ambos os grupos (sucesso e falha) conforme demonstrado na Tabela 2 do artigo científico. Trabalhos de outros pesquisadores mostram que indivíduos hospitalizados apresentam um estado de subnutrição global que inclui deficiência de diversos elementos traços e vitaminas, entre elas, o ascorbato. Este quadro de subnutrição pode estar associado ao quadro nutricional prévio, visto que algumas doenças podem causar períodos de anorexia, ou inadequada digestão e absorção de nutrientes. Já durante a internação hospitalar o paciente pode desenvolver um quadro de desnutrição devido ao período prolongado de inadequada ingestão de nutrientes, aumento das perdas de micronutrientes, como o ocorrido em fístulas intestinais, diálise, e pacientes com queimaduras extensas (SHENKIN, 2008).

Outro estudo que vem de encontro com nossos achados mostrou que pacientes vítimas de trauma e/ou infecção apresentam diminuição dos níveis de vitamina C e são necessárias doses elevadas de suplementação para que haja normalização dos níveis plasmáticos (LONG *et al.*, 2003).

Sabemos que estes níveis plasmáticos diminuídos não estão relacionados à administração diferencial de vitamina C, pois os pacientes de ambos os grupos, sucesso e falha, possuíam o mesmo alvo terapêutico para nutrição clínica

recebendo quantidades de nutrientes de forma semelhante. Entre eles, a vitamina C, que foi administrada por via enteral na dose de 42 mg/100mL de dieta, dosagem semelhante a administrada em outros estudos (PONTES *et al.*, 2006).

A vitamina C é absorvida pelas células do epitélio intestinal por receptores específicos que são capazes de transportar o ascorbato através do enterócito para o sangue (BOYER *et al.*, 2005).

O “pool” de ácido ascórbico ocorre em humanos quando a quantidade de vitamina C encontra-se em 20 mg/Kg de peso corporal. Depois de atingida esta relação ocorre a excreção do excesso por via renal (LONG *et al.*, 2003). Os rins possuem papel fundamental na manutenção da homeostase da vitamina C, pois realizam tanto sua excreção como sua reabsorção (SAVINI *et al.*, 2007).

A diferença de ácido ascórbico encontrada nos grupos sucesso e falha não se deve a reabsorção renal, uma vez que em ambos os grupos existiam pacientes com função renal normal e outros em regime de Terapia de Substituição Renal (TSR). E quando comparamos os níveis de vitamina C dos pacientes que estavam sob regime de TSR, contínua ou intermitente, versus os pacientes com função renal normal, não encontramos diferenças entre os grupos ($p=0,675$) nos níveis de vitamina C (dados não apresentados).

O termo vitamina C define tanto a sua forma oxidada, (dihidroascorbato) como sua forma reduzida (ascorbato). O ascorbato é transportado por uma proteína de elevada afinidade, denominada Transportador de Vitamina C dependente de Sódio (SVCT) que transporta o ascorbato, utilizando dois íons de sódio para cada molécula de ascorbato. Tem sido proposto que a energia necessária para a absorção da concentração de ascorbato é proporcionada pela

diferença das concentrações dos íons sódio, através da membrana plasmática (CORTI *et al.*, 2010).

Existem duas isoformas de SVCT clonados em humanos (SVCT-1 e SVCT-2), as quais são codificadas pelos genes SLC23A1 e SLC23A2 respectivamente. A expressão de SVCT-2 ocorre largamente pela captação de ácido L-ascórbico na maioria dos tecidos do corpo (incluindo o músculo esquelético), enquanto SVCT-1 participa da homeostase corporal regulando as necessidades metabólicas através da absorção intestinal e reabsorção tubular renal de vitamina C. SVCT-1 e SVCT-2 estão sujeitos à regulação sob diferentes condições fisiológicas e fisiopatológicas nos níveis transcricionais e pós-transcricionais. Tanto *in vitro*, como *in vivo*, estudos revelam mecanismos de controle na transcrição dos SVCTs ativados através de hormônios e moléculas de sinalização intracelular (SAVINI *et al.*, 2007). Porém não existem estudos relacionando o transporte de ascorbato no diafragma ou músculo esquelético.

O mecanismo que leva um tecido lesado a reduzir o transporte de um composto antioxidante é uma questão em aberto que deve ser esclarecido.

A vitamina C tem importante papel intracelular como antioxidante. É um potente agente redutor, e participa como cofator de vários processos de oxirredução. Está envolvida, juntamente com o Fe(II) na degradação de HIF em situações de normóxia intracelular (MANDL *et al.*, 2009). Em nossos achados não encontramos diferença nas concentrações de ferro e seus transportadores, entre os grupos sucesso e falha, que evidenciasse o consumo de ascorbato por esta rota. Também verificamos que os pacientes de ambos os grupos apresentam padrões gasométricos idênticos (Tabela 1 do artigo científico).

Contudo, apesar dos baixos níveis de vitamina C em ambos os grupos estudados, nosso trabalho verificou que os pacientes que apresentaram falha possuem níveis de vitamina C mais elevados, quando comparado ao grupo que apresentou sucesso no desmame da VM conforme observado na Tabela 2 do artigo científico. Estes resultados nos levam a acreditar que os pacientes do grupo falha apresentavam alguma alteração no transporte da vitamina C para o meio intracelular como encontrado no estudo que apresentou redução da expressão de receptores SVCT-2 em cardiomiócitos expostos à doxirrubicina (droga cardiotoxic) (LUCKED et al., 2012). Sugerimos que os indivíduos no grupo de falha teriam diminuído a captação de ascorbato pelo tecido muscular, devido à redução da expressão de receptores de vitamina C, contribuindo para a disfunção do músculo diafragmático.

O óxido nítrico tem várias funções fisiológicas importantes. Sabe-se que o NO é sintetizado pelas células endoteliais vasculares podendo difundir-se em todas as direções, parte dele irá alcançar o músculo liso subjacente tendo como resultado o relaxamento muscular, e por consequência a diminuição da pressão sanguíneas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O NO tem papel importante papel na resposta inflamatória, diminui a ativação de monócitos, inibe a adesão plaquetária e a ativação de leucócitos. O NO também pode atuar bloqueando a ativação de produtos citotóxicos e vasoconstritores, além de ter efeito citoprotetor direto sobre a célula endotelial durante a reação inflamatória (CHECCHIA *et al.*, 2012).

Os níveis de expressão de NO possuem relação inversamente proporcional com algumas patologias crônicas. Alguns pesquisadores encontraram esta

relação na hipertensão arterial sistêmica, insuficiência renal crônica, doenças cardiovasculares, hipercolesterolemia e diabetes. Por outro lado, algumas situações clínicas apresentam relação diretamente proporcional com os níveis de NO como: sepsis, hemodiálise, resposta imune e inflamatória aguda (SIERVO *et al.*, 2011).

Em nosso trabalho utilizamos uma técnica que mede indiretamente as quantidades de NO no plasma, através da quantificação dos nitritos e nitratos que podem refletir a síntese de NO pelo endotélio vascular. Sabe-se que os nitratos podem ser absorvidos através da dieta (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Contudo nossos pacientes estavam sob o mesmo regime nutricional o que impossibilita a ocorrência deste viés na análise dos dados.

Alguns autores propõem que a inibição da síntese de NO pode alterar o fluxo sanguíneo para órgãos e sistemas, gerando aumento da resistência vascular e por consequência a hipoperfusão. A ocorrência deste processo no tecido muscular aceleraria o processo de fadiga muscular (ALBERTINI *et al.*, 1997, AMEREDES & PROVENZANO, 1999).

O modelo de estudo de SMITH & REID (2006), propõe que que fibras musculares adjacentes a vasculatura podem expressar a óxido nítrico sintase (NOS) e não somente as células do endotélio vascular.

Em nosso estudo observamos que o grupo sucesso apresentou níveis de nitritos e nitratos aumentados no plasma quando comparados ao grupo falha. Inferimos desta forma que possa ocorrer o aumento da expressão de NOs pelo musculo diafragmático e pelo endotélio vascular facilitando a perfusão muscular, auxiliando no desfecho positivo para obtenção do sucesso no teste de ventilação

espontânea e conseqüentemente sua extubação.

Cobaias submetidas a VM desenvolveram atrofia da musculatura diafragmática por processos que incluem o estresse oxidativo. A biópsia do diafragma deste animais evidenciaram a peroxidação lipídica como um dos produtos decorrentes do dano muscular (MAES *et al.*, 2008, JABER *et al.*, 2005, KAVAZIS *et al.*, 2009).

Outros ensaios ilustram ainda que a administração de antioxidantes em animais submetidos à VM podem apresentar diminuição da peroxidação lipídica, bem como, atenuar os efeitos deletérios da VM na contratibilidade da musculatura diafragmática (WHIDDEN *et al.*, 2009).

Não encontramos na literatura estudo semelhante ao nosso, que realizou mensuração da peroxidação lipídica no plasma de pacientes submetidos ao processo de desmame da VM. Os achados literários são na sua grande maioria alvo específicos. Utilizam o diafragma para realizar mensuração de alterações oxidativas e busca de danos estruturais e bioquímicos.

Nossos resultados evidenciam maior peroxidação lipídica no plasma dos pacientes que apresentaram falha no teste de ventilação espontânea. Sabemos que os pacientes de UTI apresentam inúmeras situações que podem levar aumento dos danos em lipídios, causados pelo estresse oxidativo (GRUNE & BERGER, 2007). Contudo devemos lembrar que ao ser submetido ao teste de ventilação espontânea o paciente encontra-se em um momento de melhora clínica. Todos os indivíduos de nosso estudo estavam sendo julgados pelo protocolo de desmame institucional (Anexo 1.) que preconiza uma estabilidade clínica adequada para realização dos testes.

Não podemos afirmar que este dano está ocorrendo em células da musculatura diafragmática, visto que a coleta se deu em tecido sanguíneo, e por sua vez a peroxidação lipídica pode estar ocorrendo em qualquer tecido ou órgão do indivíduo submetido ao teste de ventilação espontânea e/ou VM. Para maiores esclarecimentos deste achado teríamos que mensurar ao mesmo tempo o dano em lipídios no tecido sanguíneo e no diafragma, através de coleta e biópsia respectivamente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho desperta a possibilidade de encontrarmos preditores de sucesso de testes de ventilação espontânea, bem como de desmame de ventilação em tecido sanguíneo. As alterações encontradas nos antioxidantes vitamina C e NO, bem como as medidas de danos em lipídeos (MDA) mostram-se diferentes antes mesmo do início dos testes de ventilação espontânea e permanecem alteradas durante os demais momentos em que foram mensuradas.

Sabe-se do papel do músculo diafragmático para obter-se sucesso no desmame da ventilação. Porém mensurar possíveis danos e alterações oxidativas neste músculo requer a realização de procedimento cirúrgico. Podemos futuramente prever alterações oxidativas através da coleta de marcadores sanguíneos o que seria mais fácil e menos oneroso ao paciente.

Este trabalho é o primeiro estudo que encontrou alterações oxidativas no tecido sanguíneo de pacientes em regime de ventilação mecânica e submetido aos testes de ventilação espontânea.

PERSPECTIVAS

As principais perspectivas para este estudo são: a utilização de suplementação de vitamina C nos pacientes submetidos à terapia de ventilação mecânica, visando minimizar o tempo de VM bem como otimizar o processo do desmame; realizar aumento do número de indivíduos em ambos os grupos buscando desfechos que venham reforçar e corroborar com os resultados já evidenciados; realizar estudo semelhante com cobaias correlacionando os achados em tecido sanguíneo com músculo diafragmático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertini, M., Lafortuna, C., & Aguggini, G. (1997). Effects of nitric oxide on diaphragmatic muscle endurance and strength in pigs. *Experimental Physiology*, 82(1), 99-106.
- Alberto, M. E., Russo, N., Grand, A., & Galano, A. (2013). A physicochemical examination of the free radical scavenging activity of Trolox: mechanism, kinetics and influence of the environment. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(13), 4642-4650.
- Ameredes, B. T., & Provenzano, M. A. (1999). Influence of nitric oxide on vascular resistance and muscle mechanics during tetanic contractions in situ. *Journal of Applied Physiology*, 87(1), 142-151.
- Barreiro, E., Galdiz, J. B., Marinan, M., Alvarez, F. J., Hussain, S. N. A., Gea, J., et al. (2006). Respiratory loading intensity and diaphragm oxidative stress: N-acetyl-cysteine effects. *Journal of Applied Physiology*, 100(2), 555-563.
- Betters, J. L., Criswell, D. S., Shanely, R. A., Van Gammeren, D., Falk, D., DeRuisseau, K. C., et al. (2004). Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(11), 1179-1184.
- Boles, J. M., Bion, J., Connors, A., Herridge, M., Marsh, B., Melot, C., et al. (2007). Weaning from mechanical ventilation. *European Respiratory Journal*, 29(5), 1033-1056.
- Bowler, R. P., Velsor, L. W., Duda, B., Chan, E. D., Abraham, E., Ware, L. B., et al. (2003). Pulmonary edema fluid antioxidants are depressed in acute lung injury. *Critical Care Medicine*, 31(9), 2309-2315.
- Boyer, J. C., Campbell, C. E., Sigurdson, W. J., & Kuo, S. M. (2005). Polarized localization of vitamin C transporters, SVCT1 and SVCT2, in epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(1), 150-156.
- Campos, R., Massola Shimizu, M. H., Volpini, R. A., de Braganca, A. C., Andrade, L., Quirino dos Santos Lopes, F. D. T., et al. (2012). N-acetylcysteine prevents pulmonary edema and acute kidney injury in rats with sepsis submitted to mechanical ventilation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(7), 1640-1650.
- Carvalho, C. R. R., Junior, T. J., Franca, S. A. (2007) III Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica. *J Bras Pneumol.(Supl 2): S 54 - S 70.*
- Chastre, J., & Fagon, J. Y. (2002). Ventilator-associated pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165(7), 867-903.
- Checchia, P. A., Bronicki, R. A., & Goldstein, B. (2012). Review of Inhaled Nitric Oxide in the Pediatric Cardiac Surgery Setting. *Pediatric Cardiology*, 33(4), 493-505.
- Cooper, L. M., & Linde-Zwirble, W. T. (2004). Medicare intensive care unit use: Analysis of incidence, cost, and payment. *Critical Care Medicine*, 32(11), 2247-2253.
- Corti, A., Casini, A. F., & Pompella, A. (2010). Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(2), 107-115.
- Cox, A. G., Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2010). Mitochondrial

- peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochemical Journal*, 425, 313-325.
- Davidovich, N., Dipaolo, B. C., Lawrence, G. G., Chhour, P., Yehya, N., Margulies, S. S., et al. (2012). Cyclic Stretch Induced Oxidative Injury Increases Alveolar Permeability via ERK-NF-kappa B Signaling. *2012 38th Annual Northeast Bioengineering Conference (Nebec)*, 241-242.
- Davies, M. B., Austin, J., Partridge, D. A. (1991). Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry. *Royal Society of Chemistry, Cambridge*.
- Ely, E. W., Baker, A. M., Dunagan, D. P., Burke, H. L., Smith, A. C., Kelly, P. T., et al. (1996). Effect on the duration of mechanical ventilation of identifying patients capable of breathing spontaneously. *New England Journal of Medicine*, 335(25), 1864-1869.
- Esteban, A., Anzueto, A., Frutos, F., Alia, I., Brochard, L., Stewart, T. E., et al. (2002). Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation - A 28-day international study. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 287(3), 345-355.
- Falk, D. J., DeRuisseau, K. C., Van Gammeren, D. L., Deering, M. A., Kavazis, A. N., & Powers, S. K. (2006). Mechanical ventilation promotes redox status alterations in the diaphragm. *Journal of Applied Physiology*, 101(4), 1017-1024.
- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6), 1583-1606.
- Gayan-Ramirez, G. N., & Decramer, M. L. (2005). Diaphragm antioxidant system in controlled mechanical ventilation in piglets: short term vs. prolonged mechanical ventilation response. *Intensive Care Medicine*, 31(10), 1303-1305.
- Grune, T., & Berger, M. M. (2007). Markers of oxidative stress in ICU clinical settings: present and future. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 10(6), 712-717.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. 4a ed. *Oxford University Press*.
- Heyland, D., John Muscedere, J., Wischmeyer, P. E., Deborah Cook, D., Jones, G., Albert, M., Elke, G., Berger, M. M., Day, G. A. (2013). A Randomized Trial of Glutamine and Antioxidants in Critically Ill Patients. *N Engl J Med*, 368:1489-1497.
- Jaber, S., Sebbane, M., & Matecki, S. (2006). Comment on "Effects of short vs. prolonged mechanical ventilation on antioxidant systems in piglet diaphragm" by Jaber et al. - Reply to the comment by Dr. Kevin. *Intensive Care Medicine*, 32(9), 1447-1447.
- Kavazis, A. N., Talbert, E. E., Smuder, A. J., Hudson, M. B., Nelson, W. B., & Powers, S. K. (2009). Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(6), 842-850.
- Kelm, M. (1999). Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1411(2-3), 273-289.
- Knaus, W. A., Draper, E. A., Wagner, D. P., & Zimmerman, J. E. (1985). APACHE-II - A SEVERITY OF DISEASE CLASSIFICATION-SYSTEM. *Critical Care*

- Medicine*, 13(10), 818-829.
- Kojo, S. (2004). Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 11(8), 1041-1064.
- Kollef, M. H., Shapiro, S. D., Silver, P., StJohn, R. E., Prentice, D., Sauer, S., et al. (1997). A randomized, controlled trial of protocol-directed versus physician-directed weaning from mechanical ventilation. *Critical Care Medicine*, 25(4), 567-574.
- Lecuona, E., Sassoon, C. S., & Barreiro, E. (2012). Lipid Overload: Trigger or Consequence of Mitochondrial Oxidative Stress in Ventilator-induced Diaphragmatic Dysfunction? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(11), 1074-1076.
- Levine, S., Nguyen, T., Taylor, N., Friscia, M. E., Budak, M. T., Rothenberg, P., et al. (2008). Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *New England Journal of Medicine*, 358(13), 1327-1335.
- Long, C. L., Maull, K. I., Krishnan, R. S., Laws, H. L., Geiger, J. W., Borghesi, L., et al. (2003). Ascorbic acid dynamics in the seriously ill and injured. *Journal of Surgical Research*, 109(2), 144-148.
- Low, F. M., Hampton, M. B., & Winterbourn, C. C. (2008). Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1621-1629.
- Ludke, A. R., Sharma, A. K., Akolkar, G., Bajpai, G., & Singal, P. K. (2012). Downregulation of vitamin C transporter SVCT-2 in doxorubicin-induced cardiomyocyte injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(6), C645-C653.
- Maes, K., Testelmans, D., Cadot, P., DeRuisseau, K., Powers, S. K., Decramer, M., et al. (2008). Effects of Acute Administration of Corticosteroids during Mechanical Ventilation on Rat Diaphragm. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(12), 1219-1226.
- Mandl, J., Szarka, A., & Banhegyi, G. (2009). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 157(7), 1097-1110.
- Mion, L. C., Minnick, A. F., Leipzig, R. M., Catrambone, C. D., & Johnson, M. E. (2007). Patient-initiated device removal in intensive care units: A national prevalence study. *Critical Care Medicine*, 35(12), 2714-2720.
- Monostori, P., Wittmann, G., Karg, E., & Turi, S. (2009). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(28), 3331-3346.
- Moore, K., & Roberts, L. J. (1998). Measurement of lipid peroxidation. *Free Radical Research*, 28(6), 659-671.
- Oliveira, L. R. C., José, A. et al. (2006). Padronização do Desmame da Ventilação Mecânica em Unidade de Terapia Intensiva: Resultados após Um Ano. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 18: 131 – 136.
- Picard, M., Jung, B., Liang, F., Azuelos, I., Hussain, S., Goldberg, P., et al. (2012). Mitochondrial Dysfunction and Lipid Accumulation in the Human Diaphragm during Mechanical Ventilation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(11), 1140-1149.
- Pontes-Arruda, A., Albuquerque Aragao, A. M., & Albuquerque, J. D. (2006). Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid,

- and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock. *Critical Care Medicine*, 34(9), 2325-2333.
- Powers, S. K., Wiggs, M. P., Duarte, J. A., Zergeroglu, A. M., & Demirel, H. A. (2012). Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 303(1), E31-E39.
- Reddy, S. P., Hassoun, P. M., & Brower, R. (2007). Redox imbalance and ventilator-induced lung injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(11), 2003-2012.
- Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., Avigliano, L., & Catani, M. V. (2008). SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*, 34(3), 347-355.
- Shanely, R. A., Zergeroglu, M. A., Lennon, S. L., Sugiura, T., Yimlamai, T., Enns, D., et al. (2002). Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(10), 1369-1374.
- Shenkin, A. (2008). Basics in clinical nutrition: trace elements and vitamins in parenteral and enteral nutrition. e-SPEN, *The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 3(3):e293-7.
- Shuvaeva, T. M., Novoselov, V. I., Fesenko, E. E., & Lipkin, V. M. (2009). Peroxiredoxins, a new family of antioxidant proteins. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 35(5), 523-537.
- Siervo, M., Stephan, B. C. M., Feilisch, M., & Bluck, L. J. C. (2011). Measurement of in vivo nitric oxide synthesis in humans using stable isotopic methods: a systematic review. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(4), 795-804.
- Singh, B. C., Bag, P. P., Kumakura, F., Iwaoka, M., & Priyadarsini, K. I. (2010). Role of Substrate Reactivity in the Glutathione Peroxidase (GPx) Activity of Selenocystine. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 83(6), 703-708.
- Smith, M. A., & Reid, M. B. (2006). Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 151(2-3), 229-241.
- Teixeira, P. J. Z., Hertz, F. T., et al (2004). Pneumonia associada à ventilação mecânica: Impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. *J Bras Pneumol*, 30(6): 540 -548.
- Vieira, S. R. R., Savi, A., et al. (2008). Predicting success in weaning from mechanical ventilation. *Critical Care Medicine*, 12(suppl2): 328.
- Viña, J., Borras, C., Gambini, J., Sastre, J., & Pallardo, F. V. (2005). Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *Febs Letters*, 579(12), 2541-2545.
- Viña, J., Hems, R. & Krebs, H. A. (1978). Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes. *Biochemical Journal*, 170: 627-630.
- Wagner, D. P (1989).. Economics of prolonged mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis*, 140: S14–S18.
- Whidden, M. A., McClung, J. M., Falk, D. J., Hudson, M. B., Smuder, A. J., Nelson, W. B., et al. (2009). Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *Journal of Applied Physiology*, 106(2), 385-394.
- Wu, G. Y., & Morris, S. M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond.

Biochemical Journal, 336, 1-17.
Yoshida, Y., Umeno, A., & Shichiri, M. (2013). Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 52(1), 9-16.

CURRICULUM VITAE

Verona, C.

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Cléber Verona

Nascimento: 17/08/1981, 31 anos

Local: Canoas/RS/ Brasil

Endereço profissional:

Hospital Nossa Senhora da Conceição
Centro de Terapia Intensiva - Adulto
Av. Francisco Train, 596
Bairro Cristo Redentor
Porto Alegre, RS - Brasil
Telefone: (51) 3357-2016
E-mail: vcleber@ghc.com.br

2 FORMAÇÃO

- 1997-1999 Curso Técnico em enfermagem
Centro Tecnológico Cristo Redentor, Canoas, Rio Grande do Sul,
Brasil
- 2002-2006 Graduação em Enfermagem
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- 2007-2008 Curso de Pós Graduação Lato Sensu Enfermagem em Terapia
Intensiva IEP – Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Rio
Grande do Sul Brasil.
- 2011 - (em curso) Curso de Pós Graduação Stricto Sensu em Biologia Celular e
Molecular, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

3 CURSOS DE EXTENSÃO

Curso de Extensão em Nefrointensivismo
Carga Horária: 30 h
Ano: 2012

4 AJUDAS HUMANITÁRIAS

2010 - Haiti - Auxílio às vítimas do terremoto.

2010 - Alagoas - Auxílio às vítimas da enchente.

2011 – São Lourenço do Sul – Auxílio às vítimas da enchente.

2012 – Acre – Reestruturação da saúde indígena.

2013 – Santa Maria – Auxílio às vítimas do incêndio da Boate Kiss.

5 EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Hospital Nossa Senhora da Conceição.

Função: Enfermeira Assistencial

Área de Atuação: Centro de Terapia Intensiva Adulto

Admissão: setembro de 2009 até o presente

Hospital Moinhos de Vento – Programa Pós Graduação Terapia Intensiva - Enfermagem

Função: Professor

Admissão: março de 2008 até o presente

Centro de Ensino São Camilo – Pós Graduação de Enfermagem em Emergência

Função: professor

Admissão: Março de 2010 até o presente

Força Nacional do SUS no GHC

Função: coordenador

Admissão: Janeiro de 2012 até o presente

Programa de Residência Integrada em Saúde – GHC – Ênfase Paciente Crítico

Função: preceptor

Área de Atuação: Centro de Tratamento Intensivo Adulto.

Admissão: abril de 2010

Saída: abril de 2012

Hospital Moinhos de Vento

Função: Técnico de Enfermagem

Área de Atuação: Centro de Tratamento Intensivo Adulto

Admissão: Março de 2000

Saída: Setembro de 2006

6 PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS E CONGRESSOS

Verona C. Experiências de atuação na Força Nacional do SUS. I Jornada Científica do Grupo Hospitalar Conceição. Abril de 2012. Apresentação Oral.

Verona C. III Seminário de Reabilitação Física. Universidade Feevale. Abril de 2012. Moderador.

Verona C. Atendimento a catástrofes e a Força Nacional do SUS. VIII Semana de Enfermagem IPA. Maio de 2012. Apresentação Oral.

Verona C. Curso de Monitorização Hemodinâmica. II Congresso Gaúcho de Terapia Intensiva. Maio de 2012. Instrutor.

Verona C. Estratégia de reconhecimento precoce do paciente séptico. II Jornada de Terapia Intensiva do Hospital Nossa Senhora da Conceição. Agosto de 2012, Apresentação Oral.

Verona C, Salomon TB, Medeiros TM, Hackenhaar FS, Schuller AK. Association of ventilation and its weaning to oxidative stress. Free Radicals Brasil. Agosto de 2011. Pôster.

Verona C. Como auxiliar as autoridades no atendimento as vítimas de desastres naturais. Cruz Vermelha Brasileira. Agosto de 2010. Apresentação Oral.

Verona C. Contribuição conjunta Brasil – Itália, em auxílio ao terremoto do Haiti, apoio humanitário. Universidade do Sul de Santa Catarina. Junho de 2010. Apresentação Oral.

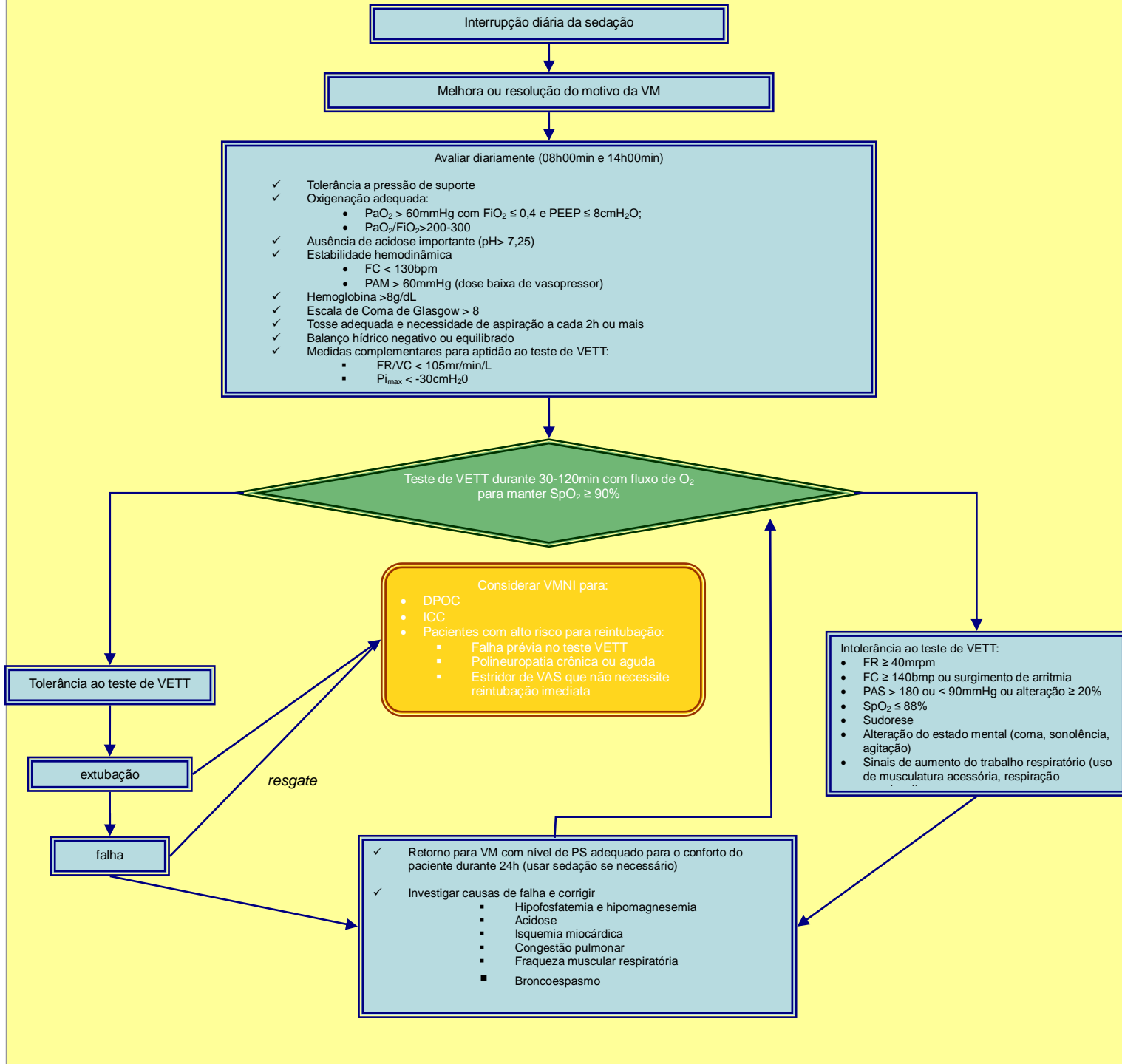
Verona C. Cuidados no Banho de leito com o paciente crítico. Congresso Sul Brasileiro de Medicina Intensiva. Maio de 2009. Apresentação Oral.

Verona C. Cuidados com o paciente durante o desmame da ventilação mecânica. Congresso Sul Brasileiro de Medicina Intensiva. Maio de 2009. Apresentação Oral.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de desmame

Protocolo de Desmame da Ventilação Mecânica



Anexo 2. Parecer da Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde.



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 08-536

| |
|--------------------------|
| Pesquisador Responsável: |
| SERGIO PINTO RIBEIRO |

Título: ASSOCIAÇÃO DA VENTILAÇÃO MECÂNICA E SEU DESMAME COM O ESTRESSE OXIDATIVO

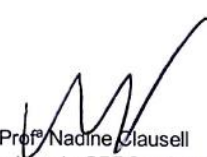
ADENDO AO PROJETO

Data da Versão:

22/01/2009

Este documento referente ao projeto acima foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 23 de janeiro de 2009.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

Apêndice 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ESTUDO SOBRE A ASSOCIAÇÃO DA VENTILAÇÃO MECÂNICA E SEU DESMAME COM O ESTRESSE OXIDATIVO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INFORMAÇÃO: O estudo “**Associação da ventilação mecânica e seu desmame com o estresse oxidativo**” tem como objetivo analisar a influência da ventilação mecânica na produção de radicais livres e seus efeitos sobre o desmame. A ventilação mecânica consiste na prestação de suporte ventilatório ao paciente através de um tubo traqueal e do respirador. O desmame seria o período em que o paciente é submetido à testes para verificar a possibilidade de ser extubado, ou seja, voltar a ventilar espontaneamente. Estudos previamente realizados demonstram que pacientes mantidos em ventilação mecânica sofrem dano oxidativo, principalmente em seu diafragma (músculo respiratório). Este dano, por sua vez, pode comprometer o desmame do paciente, impedido sua extubação. Este projeto pretende verificar a relação entre a ventilação mecânica e seu desmame, com a geração de radicais livres em níveis sanguíneos, uma vez que trabalhos são raros na literatura biomédica. Portanto, solicitamos ao Sr. a autorização para a coleta de sangue de seu familiar em no máximo 4 momentos para que possamos verificar a possível presença de dano oxidativo. Os momentos em que se realizarão a coleta de 10 mL de sangue venoso (máximo 40 mL, 10 em cada momento) irão coincidir com o processo de desmame do ventilador. A coleta será realizada pelo pesquisador através da punção de uma veia periférica.

RISCOS E DESCONFORTOS: A punção de veia periférica para coleta de exames laboratoriais é um procedimento de rotina que ocorre em todos os centros de terapia intensiva, é realizado por profissional habilitado e treinado para este procedimento. Por sua vez, convém lembrar, que será necessário “picar” o paciente para que se obtenha o sangue.

BENEFÍCIOS: Conhecer melhor as possíveis relações entre geração de radicais livres e o desmame da ventilação mecânica resultará em melhores critérios para a extubação dos pacientes mantidos com este suporte em centros de terapia intensiva. É importante salientar que quanto maior for o tempo em que o paciente for mantido em ventilação mecânica maior é a probabilidade de: desenvolver infecções, de apresentar comorbidades além de aumentar o risco de morte. Com a sua colaboração poderemos esclarecer o mecanismo do estresse oxidativo e a ventilação mecânica, buscando

futuramente encontrar ferramentas que possam reduzir os danos causados pela ventilação mecânica à pacientes em centros de terapia intensiva, reduzindo assim seu tempo de internação, suas comorbidades e a mortalidade.

CONFIDENCIALIDADE: Os pesquisadores comprometem-se a zelar pelo sigilo e anonimato das informações contidas em prontuários e bancos de dados pesquisados e também a zelar pela fidedignidade dos resultados obtidos das análises.

CONTATO: Quaisquer dúvidas ou descontentamentos com relação à participação no estudo podem ser resolvidos diretamente com o Enfermeiro Cléber Verona pelo telefone nº (51)8421-8876.

VOLUNTARIEDADE E POSSIBILIDADE DE ABANDONO: A participação no estudo ocorre de forma voluntária. Não existe qualquer imposição para que o(a) senhor(a) seja incluído. Mesmo quem não desejar participar do estudo terá assegurado o mesmo atendimento, sem quaisquer restrições. Além disso, todo o participante pode em qualquer fase da pesquisa abandonar o estudo e vetar a utilização de seus dados.

CUSTOS ADICIONAIS: A participação no estudo não acarretará em ônus adicionais ao voluntário ou ao seu plano de saúde..

NOVAS INFORMAÇÕES: Fica assegurado aos participantes o fornecimento das novas informações geradas ao longo do estudo.

ACEITAÇÃO:

() **AUTORIZO** a inclusão de meu familiar no estudo “ **A Associação da ventilação mecânica e seu desmame com o estresse oxidativo.**” e declaro que recebi uma via do presente termo.

Nome: _____ Data: / /

Assinatura: _____

Cléber Verona - Pesquisador responsável

Apêndice 2. Planilha de coleta de dados

Planilha de coleta de dados

Dados Pessoais

| |
|----------------|
| Nome: |
| Endereço: |
| Telefone: |
| Idade: |
| Sexo: |
| Origem étnica: |

Patologias Atuais:

Comorbidades? Qual(ais)?

Medicações em uso (quais? / frequência?)

Dados gasométricos (coletados no dia da tentativa de extubação):

| |
|----------------------|
| PH: |
| PCO ₂ |
| PO ₂ : |
| HCO ₃ : |
| Sat O ₂ : |
| Excesso de Base: |

Exames Laboratoriais complementares:

| |
|-------------------|
| Hematócrito: |
| Hemoglobina: |
| Proteínas totais: |
| Colesterol Total: |
| HDL: |
| Triglicerídios: |

| |
|---------------------|
| Proteína C reativa: |
| Glicose: |
| Ácido úrico: |

Sucesso na extubação: () sim ()
não