

ANDRÉ DE SÁ BRAGA OLIVEIRA

EFEITOS DA VENTILAÇÃO MECÂNICA CONTROLADA E
DA VENTILAÇÃO POR PRESSÃO DE SUPORTE SOBRE O
MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATOS

RECIFE

2010

André de Sá Braga Oliveira

Efeitos da Ventilação Mecânica Controlada e da Ventilação por
Pressão de Suporte sobre o Músculo Diafragma de Ratos

Recife

2010

André de Sá Braga Oliveira

Efeitos da Ventilação Mecânica Controlada e da Ventilação por
Pressão de Suporte sobre o Músculo Diafragma de Ratos

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Patologia do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco
(UFPE), para obtenção do título
de Mestre em Patologia.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Paloma Lys de Medeiros

CO-ORIENTADOR: Prof^ª. Dr. Diógenes Luís da Mota

RECIFE

2010

Oliveira, André de Sá Braga

Efeitos da ventilação mecânica controlada e da ventilação por pressão de suporte sobre o músculo diafragma de ratos / André de Sá Braga Oliveira. – Recife: O Autor, 2010.

74 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Diafragma. 2. Ventilação mecânica. 3. PSV. 4. AVM. I. Título.

616.26

616.744

CDU (2.ed.)

CDD (20.ed.)

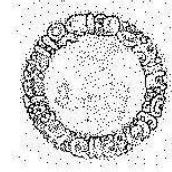
UFPE

CCS2010-067



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



Dissertação defendida para obtenção do Título de Mestre em Patologia.

Autor: **André de Sá Braga Oliveira**

Área de Concentração: **Patologia**

Nome da Dissertação: *“Efeitos da ventilação mecânica controlada e da ventilação por pressão de suporte sobre o músculo diafragma de ratos”.*

Orientadora: **Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros**

Data: **05 de Fevereiro de 2010.**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **Hilton Justino da Silva**

Prof. Dr. **Diógenes Luís da Mota**

Prof.^a Pós - Dra. **Sandra Lopes de Souza.**

AOS MEUS PAIS

É na educação dos filhos que se revelam as virtudes dos pais. Essa é mais uma conquista dedicada a vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Para isso, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhássemos sem medo e cheios de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante minhas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por proporcionar a força da certeza que nada poderá vencer a nossa fé. Quando atinjo meus objetivos, sei que é o Senhor que está me guiando e dando coragem pra enfrentar os percalços da vida. Obrigado!

PALOMA LYS DE MEDEIROS

Ainda me lembro em 2004, uma pessoa muito especial que me deu uma oportunidade de ser um estudante, um profissional, um pesquisador melhor. Após quase seis anos de convívio (mas não somente agora), vejo que o resultado desse esforço merece minha eterna gratidão. Você compartilhou seus conhecimentos, transformou meus ideais em realizações. Existe o ditado que uns são homens; alguns são professores; poucos são mestres. Aos primeiros, respeita-se; aos segundos escuta-se; aos terceiros, segue-se. Você é minha mestra! Estarei seguindo seus ensinamentos para sempre! Obrigado!

EDUARDO FRANÇA

Depositastes confiança, até mesmo quando as circunstâncias eram desfavoráveis, mas me fez acreditar que eu podia. Consegui, e acredite que esse mérito é em grande parte seu! Obrigado por participar dessa etapa em minha vida e espero que possamos estar juntos no doutorado!

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão, Henrique, que me ajudou, mesmo distante, a ter forças para a construção deste trabalho.

Às minhas avós, Zilda e Nida, exemplos de dignidade e honestidade. Dedico grande parte desse trabalho a elas.

À Professora de Anatomia Sandra Lopes de Souza, ser humano indiscutível, que sempre me incentivou e apoiou em diversas fases no caminho desse mestrado, e me fez amar a Anatomia Humana. Se hoje estou preparado para docência de alguma forma, com certeza ela é uma das grandes responsáveis.

Ao meu co-orientador Diógenes Luís da Mota, que me acompanha há bastante tempo, junto com minha orientadora, pelos conhecimentos passados ao longo desse período, pela sua seriedade e responsabilidade com a pesquisa científica, e por sempre ser prestativo quando mais precisei.

À Professora Indianara Araújo, fundamental para a construção técnica deste trabalho. Muito obrigado!

Ao Professor Antônio Roberto, chefe do Departamento de Cirurgia Experimental da UFPE, que cedeu gentilmente as dependências do seu Departamento para realização dos experimentos deste estudo.

À professora Elizabeth Chaves, que gentilmente cedeu às dependências do LIKA para realização de parte dos experimentos.

À Edeones França, que cedeu gentilmente os ratos para o estudo.

À professora Ana Lúcia Antonino, chefe da Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFPE, que gentilmente permitiu a realização do processamento histológico nas dependências do setor.

À Leopoldino e todos os funcionários da KESA - INTERMED, imprescindíveis para a viabilidade deste estudo.

Ao meu estagiário Hugo. Sempre batalhe pelo seu sonho, participe, questione, lute, e honre nossa profissão, agora que você já se tornou um fisioterapeuta. O sucesso está no trabalho e na persistência.

Aos meus colegas de mestrado Mariana e Thiago, que estavam sempre do meu lado nos momentos de incertezas que o mestrado proporciona. Ajudaram tecnicamente e emocionalmente na construção desse trabalho. Obrigado!

Ao meu amigo e colega de mestrado Tiago Franca, indispensável pra construção técnica deste trabalho. Obrigado pelo apoio neste trabalho e pela sua amizade.

RESUMO

OLIVEIRA, ASB. Efeitos da Ventilação Mecânica Controlada e da Ventilação por Pressão de Suporte sobre o Músculo Diafragma de Ratos. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

A assistência ventilatória mecânica (AVM) controlada induz profundas alterações na musculatura diafragmática, causando a chamada disfunção diafragmática induzida pela ventilação mecânica (DDIV). Essas alterações parecem poder ser atenuadas quando utilizados modos com participação da atividade diafragmática, como o de Pressão de Suporte (PSV). O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do modo ventilatório controlado por pressão controlada (PCV-C) e do modo PSV sobre a histologia e morfometria do músculo diafragma de ratos. Ratos ($n = 18$) da linhagem *Wistar* foram incluídos nesse estudo prospectivo. Após injeção intraperitoneal de anestésico e sedativo, os ratos foram distribuídos no grupo controle (RE) e para receber AVM por 6 horas no modo PCV-C e no modo PSV. Após esse período, os animais foram eutanasiados, o diafragma retirado e encaminhado para a análise histológica e morfométrica. Os resultados revelaram uma redução da área das fibras musculares de 15% no grupo PCV-C em comparação ao controle ($p < 0,001$) e de 10% quando comparado ao grupo PSV ($p < 0,05$). Já com relação ao diâmetro menor das fibras musculares observou-se uma redução de 9% do grupo PCV-C em comparação ao controle ($p < 0,001$) e de 6% em relação ao grupo PSV ($p < 0,05$). Quando avaliada a área dos mionúcleos, notou-se uma redução de 16% desse parâmetro no grupo PCV-C, comparado ao PSV ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa no perímetro dos mionúcleos entre os grupos estudados ($p > 0,05$). O grupo PCV-C apresentou atrofia muscular em um período curto de ventilação mecânica. O modo PSV parece atenuar os efeitos da DDIV, sendo uma alternativa eficiente no controle da atrofia muscular decorrente do uso do suporte ventilatório.

Palavras-chave: diafragma, ventilação mecânica, PSV, ratos, AVM.

ABSTRACT

OLIVEIRA, ASB. Effects of controlled mechanical ventilation and pressure support ventilation on diaphragm muscle of rats. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

Controlled mechanical ventilation (CMV) induces many modifications in diaphragm function and biology, called Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction (VIDD). These modifications may be attenuated by assisted modes of mechanical ventilation, like Pressure Support Ventilation (PSV). The aim of this study was analyse the effects of Pressure controlled ventilation mode (PCV-C) and PSV mode in diaphragm muscle of rats. Wistar rats (n=18) were assigned to the control group or to receive 6 hours of PCV mode and PSV mode. After this period, animals under deep anaesthesia, were euthanased, diaphragm was excised out, frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C freezer. Hematoxylin – Eosin stained sections were observed under light microscopy and morphometrical parameters were analysed using a computer aided image analysis system. Results shown a decrease in cross-sectional area of muscle fibers (15% - circa) of PCV-C group compared with control ($p<0.001$) and 10% (circa) compared with PSV group ($p<0.05$). Less diameter of muscle fibers was decreased in PCV-C group by 9% (circa) compared with control ($p<0.001$) and by 6% approximately compared with PSV group ($p<0.05$). When myonuclear area was analyzed, it was observed a decrease by 16% in PCV-C group compared with PSV ($p<0.05$). No significant difference between groups were observed in myonuclear perimeter ($p>0.05$). Short-term controlled mechanical ventilation seems to lead muscular atrophy in diaphragm fibers. PSV mode may attenuate the effects of VIDD, and might be an important alternative in the control of muscular atrophy due to the ventilator support.

Key-words: diaphragm, controlled mechanical ventilation, pressure support, rats.

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura / Métodos

- Figura 01** – Curva de fluxo x tempo. 1 – Fase limite; 2 – Fase ciclagem; 3 – Fase expiratória; 4 – Fase disparo.....**20**
- Figura 02** – Efeitos das mudanças da mecânica respiratória na pressão de vias aéreas durante a ventilação mecânica controlada por pressão controlada. A. Curvas antes de quaisquer mudanças. B. O aumento da resistência causa um decréscimo no pico de fluxo expiratório, um menor volume corrente e uma constante de tempo maior. Notar que a inspiração é ciclada a tempo antes que o fluxo caia a zero. C. Uma diminuição da complacência causa nenhuma mudança do pico de fluxo expiratório mas diminui o volume corrente e diminui a constante de tempo.**21**
- Figura 03** - Curvas de pressão e volume durante a ventilação por pressão de suporte (PSV). Notar que cada ciclo ventilatório é ativado pelo esforço do paciente. Os ciclos variam em volume corrente e tempo inspiratório de acordo com a intensidade do esforço.**22**
- Figura 04** - Organograma representando a distribuição do número de animais, com idade de 120 dias, da linhagem Wistar, em Respiração espontânea (RE), Pressão Controlada (PCV-C) e Pressão de Suporte (PSV), formando os grupos experimentais, com 6 animais em cada grupo.**29**
- Figura 05** - Rato em decúbito dorsal, sendo submetido à droga anestésica e sedativa, por via intraperitoneal.....**30**
- Figura 06** - Rato em decúbito dorsal, membros fixados com esparadrapo, após administração da droga anestésica e sedativa. Nota-se pequena incisão na porção proximal da traquéia, para introdução da cânula de traqueostomia, que encontra-se na mão do pesquisador.**30**
- Figura 07** - Após 6 horas nos grupos estudados, o rato era eutanasiado e realizado uma secção transversa do animal, para retirada do diafragma costal direito (seta preta).**33**

LISTA DE FIGURAS

Artigo Original

- Figure 01** – Schematic illustration of the experimental design used. All groups were assigned for 6 hours of SB or MV on PCV-C mode and PSV mode40
- Figure 02** - Photomicrography of right diaphragm muscle of a rat in PSV mode. We observe muscle fascicles. HE staining. 100X.....43
- Figure 03** – Photomicrography of right diaphragm muscle of a rat in PSV mode. We observe multinucleated cells, with peripheric localization (black arrows). Between fibers, connective tissue, the endomysium, is evident. (yellow arrow). HE staining. 400X44
- Figure 04** – Effects of controlled mechanical ventilation (PCV-C) and Pressure Support Ventilation (PSV) on area of rat diaphragm muscle fibers. We observe muscle atrophy in PCV-C group compared to control group (SB) and compared with PSV group. Values are represented as mean \pm standard deviation. **a** ($p<0,001$) points difference between PCV-C and SB groups; **b** ($p<0,05$) points difference between PCV-C and PSV groups (Mann-Whitney test).....45
- Figure 05** - Effects of controlled mechanical ventilation (PCV-C) and Pressure Support Ventilation (PSV) in minor diameters of rat diaphragm muscle fibers. We observe muscle atrophy in PCV-C group compared to control group (SB) and compared with PSV group. Values are represented as mean \pm standard deviation. **a** ($p<0,001$) points difference between PCV-C and SB groups; **b** ($p<0,05$) points difference between PCV-C and PSV groups (Mann-Whitney test).....45
- Figure 06** - Effects of controlled mechanical ventilation (PCV-C) and Pressure Support Ventilation (PSV) in myonucleus area of rat diaphragm muscle fibers. We observe muscle atrophy in PCV-C group compared to PSV group. Values are represented as mean \pm standard deviation. **a** ($p<0,05$) (ANOVA, followed by Tukey test).....47
- Figure 07** - Effects of controlled mechanical ventilation (PCV-C) and Pressure Support Ventilation (PSV) in myonucleus perimeter of rat diaphragm muscle fibers. No differences were observed between groups ($p>0,05$). Values are represented as mean \pm standard deviation. (ANOVA, followed by Tukey test).....47

LISTA DE TABELAS

Revisão da literatura

Tabela 01 – Aplicabilidades da ventilação mecânica **19**

Artigo Original

Tabela 01 – Body weight of PCV-C, PSV and SB..... **43**

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
3 MÉTODOS	28
3.1 Animais e desenho do estudo	28
3.2 Preparo dos animais.....	29
3.3 Grupos experimentais	31
3.4 Monitorização Animal e Cuidados durante a Ventilação Mecânica	31
3.5 Análise Histológica e Morfométrica.....	32
3.6 Análise Estatística	34
4 RESULTADOS	36
ABSTRACT	37
INTRODUCTION	38
METHODS	39
Animals and experimental design.....	39
Protocol for Controlled Mechanical Ventilation group (PCV-C)	40
Protocol for Pressure Support Ventilation group (PSV)	41
Protocol for Spontaneous Breathing group (SB).....	41
Histological and histomorphometric analysis.....	41
Statistical Analysis	42
RESULTS	42
General Findings	42
Histological Analysis.....	43
Area and minor diameter of muscle fibers	44
Area and perimeter of myonucleus.....	46
DISCUSSION.....	48
Analysis of experimental design	48
Muscle Atrophy	49
AKNOWLEDGEMENTS	52
CONFLICTING INTERESTS	52
AUTHORS' CONTRIBUTIONS	52
REFERENCES	52
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	67
ANEXO I - Normas da revista Respiratory Medicine.....	67
ANEXO II – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE	74

1 Apresentação

1 APRESENTAÇÃO

A ventilação mecânica é utilizada para manter a ventilação alveolar adequada em pacientes que são incapazes de fazê-la independentemente. A retirada de pacientes do ventilador é denominada desmame. O desmame difícil é definido como um procedimento de desmame que requer mais do que 48 horas para remover permanentemente os pacientes do ventilador e ocorre em 25% dos pacientes que estão em assistência ventilatória (LEMAIRE, 1993). Clinicamente, isto é significativo, visto que o desmame participa de 40% do tempo total de ventilação mecânica.

O diafragma é o principal músculo inspiratório em mamíferos, e evidências indicam que menos de 12 horas de ventilação mecânica resulta em um decréscimo na produção de força diafragmática (POWERS,2002), sendo este exacerbado com o aumento do tempo de permanência no ventilador (LE BOURDELLES, 1994). A disfunção diafragmática induzida pela ventilação mecânica (DDIV) é importante porque a fraqueza muscular dos músculos respiratórios é um fator determinante para aumentar a dificuldade no desmame.

A atrofia muscular por desuso é um mecanismo chave que contribui para a DDIV. A redução da massa muscular diafragmática e/ou a atrofia das fibras musculares após a ventilação mecânica controlada (VMC) tem sido observada na maioria dos estudos experimentais em que esses parâmetros foram avaliados (ANZUETO et al, 1997; YANG et al, 2002; BERNARD et al, 2003; GAYAN-RAMIREZ et al, 2003)

Desta forma, a ventilação mecânica controlada induz modificações profundas no metabolismo protéico do tecido muscular, levando a atrofia muscular e à severa disfunção diafragmática induzida pela ventilação mecânica (LEVINE et al, 2008). Acredita -se que essas modificações podem ser atenuadas com a participação do paciente na ventilação mecânica (FUTIER, et al, 2008). Ao contrário da VMC, outras formas de ventilação mecânica, como a ventilação mecânica assistida (VMA) e ventilação por Pressão de Suporte (PSV), são associadas à ativação neural parcial e à atividade mecânica do diafragma. Fundamentado nessas informações, é lícito argumentar que modos assistidos de ventilação mecânica não devem produzir uma perda da função diafragmática tão grande como a ocorrida na VMC.

Existem apenas dois trabalhos na literatura que avaliaram o efeito de modos assistidos de ventilação mecânica sobre o músculo diafragma de ratos (FUTIER et al, 2008; SASSOON, 2004). Nestes, foram utilizados dois modos diferentes de AVM com a participação da

mecânica diafragmática e os parâmetros avaliados também foram desiguais. Desta forma, até o momento, não há uma clara definição sobre os efeitos de modos assistidos sobre o músculo diafragma. Devido a essa carência de estudos na literatura e a importância do desmame precoce dos pacientes submetidos à AVM, o objetivo deste trabalho foi analisar a estrutura histológica e os parâmetros morfométricos das fibras musculares e dos mionúcleos do músculo diafragma de ratos, submetidos à AVM nos modos PCV-C e PSV. Hipotetiza-se que a ventilação mecânica controlada através do modo pressórico (PCV-C) causaria lesão diafragmática em ratos, porém o modo ventilação por pressão de suporte (PSV), que preserva a atividade muscular diafragmática durante o suporte ventilatório, diminuiria os efeitos dessa lesão.

Esta dissertação será apresentada no formato de um artigo original, intitulado “Effects Of Controlled Mechanical Ventilation And Pressure Support Ventilation In Rat Diaphragm Muscle”, submetido à revista *Respiratory Medicine*, seguindo as normas da mesma (ANEXO I).

2 Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

A assistência ventilatória mecânica (AVM) é um método de suporte ventilatório utilizado em unidades de terapia intensiva (UTIs) para promover a ventilação e oxigenação, sendo comumente usado na reversão da insuficiência respiratória aguda (IRpA) (SASSOON et al, 2002). O principal objetivo de sua aplicabilidade consiste em minimizar o trabalho respiratório do paciente, substituindo temporariamente a bomba muscular respiratória (AZEREDO et al, 2003; SHANELY et al, 2003 e LORETTA et al, 2005). A Tabela 1 demonstra outras aplicabilidades da ventilação mecânica.

Tabela 1 - Aplicabilidades da ventilação mecânica

Reversão da hipoxemia severa
Reversão da acidose respiratória aguda
Alívio do estresse respiratório
Prevenção de atelectasias
Reversão da fadiga muscular respiratória
Permitir a sedação e o bloqueio neuromuscular
Diminuir o consumo de oxigênio sistêmico ou miocárdico
Redução da pressão intracraniana a partir da hiperventilação

(HOWMAN, 1999)

O antigo filósofo e médico grego Claudius Galen (129 – 210 D.C.) foi o primeiro a descrever a ventilação artificial de um animal. Mais de 1000 anos depois, no século 16, esta técnica foi aplicada na ressuscitação humana. Porém, a ventilação mecânica só veio a ser a principal intervenção terapêutica na epidemia de poliomielite que ocorreu na Europa e Estados Unidos entre 1940 e 1950. A partir deste marco histórico, vários tipos de ventiladores e modos ventilatórios foram desenvolvidos para o tratamento da insuficiência respiratória (Galen, 1954).

Deste modo, há, atualmente, diversas formas de iniciar e manter o paciente em ventilação mecânica. Didaticamente, um único ciclo respiratório, durante ventilação com pressão positiva, nas vias aéreas, pode ser dividido em quatro fases (Figura 01).

- I- Fase de disparo: é o início do ciclo ventilatório mecânico. Pode ser desencadeada pelo ventilador ou pelo paciente. Há mecanismos de disparo por tempo, pressão ou fluxo.

II- Fase de limite: é a fase que um determinado parâmetro pré-programado (pressão, fluxo, por exemplo) é sustentado durante toda inspiração. Pode ou não haver programação de pausa inspiratória.

III-Fase de ciclagem: o ventilador deverá interromper a fase inspiratória (após a pausa inspiratória, quando ela estiver sendo utilizada) e permitir o início da fase expiratória; é o que se chama de ciclagem, dispondo-se hoje de ciclagem por critérios de pressão, fluxo, volume e tempo

IV-Fase expiratória: o ventilador deverá permitir o esvaziamento dos pulmões, normalmente, de forma passiva.

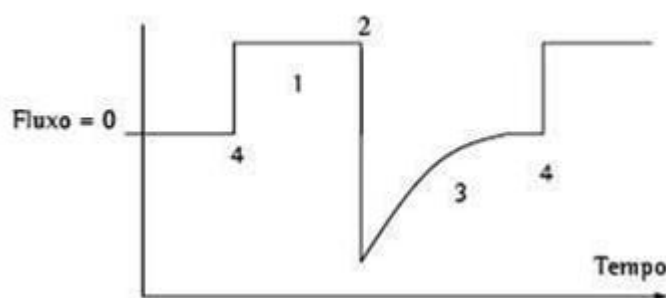


Figura 01 – Curva de fluxo x tempo. 1 – Fase limite; 2 – Fase ciclagem; 3 – Fase expiratória; 4 – Fase disparo (CHATBURN, 2003).

Portanto, de acordo com essas fases, foram desenvolvidos os modos básicos de suporte ventilatório, que podem ser espontâneos (CPAP), controlados (CMV, por volume ou pressão), assistidos (AMV, por volume ou pressão) ou combinados (assistido-controlado – ACMV, mandatório intermitente sincronizado ou não – SIMV, IMV). O início da ventilação invasiva geralmente ocorre no modo controlado. Os modos assistidos implicam em maior trabalho muscular e consumo de oxigênio que os modos controlados. A SIMV associa-se a maior trabalho muscular respiratório do que a AMV e a CMV. A partir dos modos básicos de suporte ventilatório, foram criados, concomitantemente, os modos de controle, que podem ser por pressão (PCV, PSV) ou volume (VCV) (DAVID, 2001).

A ventilação por pressão controlada (PCV) é uma modalidade na qual o ventilador, disparado pelo paciente (ciclos assistidos) ou pelo tempo (ciclos controlados), emite um fluxo inspiratório de padrão desacelerado, determinando rápido aumento na pressão das vias aéreas (Figura 02). A pressão nas vias aéreas, previamente estabelecida, é mantida durante toda a

inspiração (fase de limite), cuja duração também é predeterminada em função da ciclagem (passagem da inspiração para expiração) a tempo. Dessa forma, nos ciclos controlados, de modo diferente da ventilação ciclada a volume, o volume corrente e o fluxo inspiratório variam em função da pressão estabelecida, do tempo inspiratório e das características de resistência e complacência do sistema respiratório. Nos casos em que o ciclo for assistido haverá influência, também, do esforço do paciente (BRANSON, 1992). Teoricamente, em função de um fluxo inicial alto para atingir rapidamente a pressão determinada, seguida de uma desaceleração do fluxo para manter a pressão constante nas vias aéreas durante toda a inspiração, a ventilação pressão-controlada melhoraria as trocas gasosas, otimizando a relação ventilação- perfusão (PINHEIRO, et al, 2002).

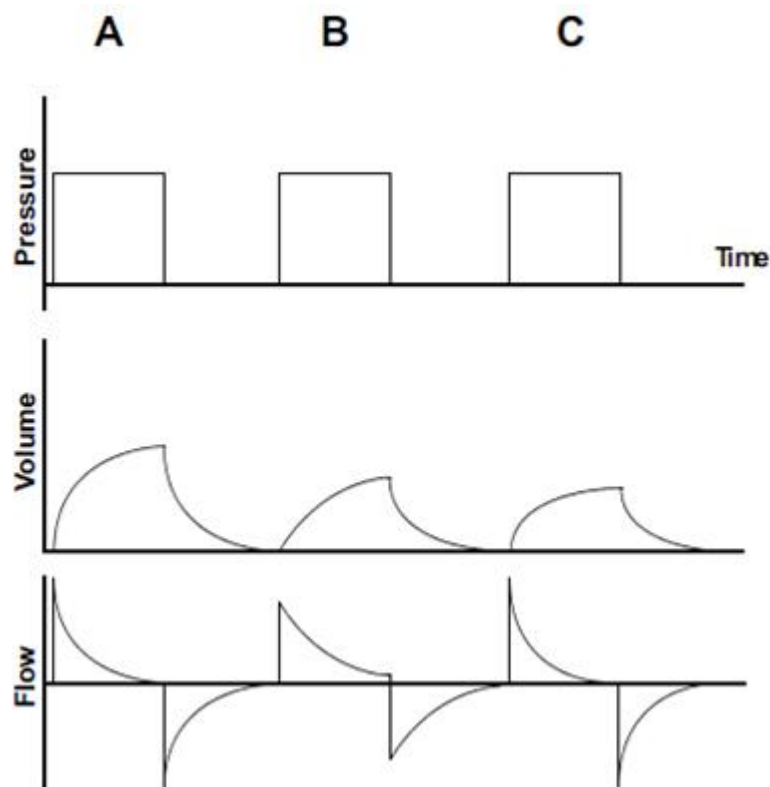


Figura 02 – Efeitos das mudanças da mecânica respiratória na pressão de vias aéreas durante a ventilação mecânica controlada por pressão controlada. **A.** Curvas antes de quaisquer mudanças. **B.** O aumento da resistência causa um decréscimo no pico de fluxo expiratório, um menor volume corrente e uma constante de tempo maior. Notar que a inspiração é ciclada a tempo antes que o fluxo caia a zero. **C.** Uma diminuição da complacência causa nenhuma mudança do pico de fluxo expiratório mas diminui o volume corrente e diminui a constante de tempo (CHATBURN, 2003)..

Quanto à ventilação por pressão de suporte (PSV), trata-se de um modo assistido muito utilizado nas UTIs. Nesta situação, o paciente precisa de um estímulo respiratório efetivo. Ao iniciar o ciclo ventilatório o ventilador fornece um fluxo gasoso necessário (curva desacelerada) para alcançar e manter uma pressão predeterminada (Figura 3). O paciente controla o ciclo respiratório. O volume corrente depende da intensidade e do tempo que o paciente faz o esforço pra deflagrar o ciclo ventilatório e das condições mecânicas do sistema respiratório. O ciclo respiratório termina quando o fluxo inspiratório diminui cerca de 25% em função do fluxo inicial (DAVID, 2001).

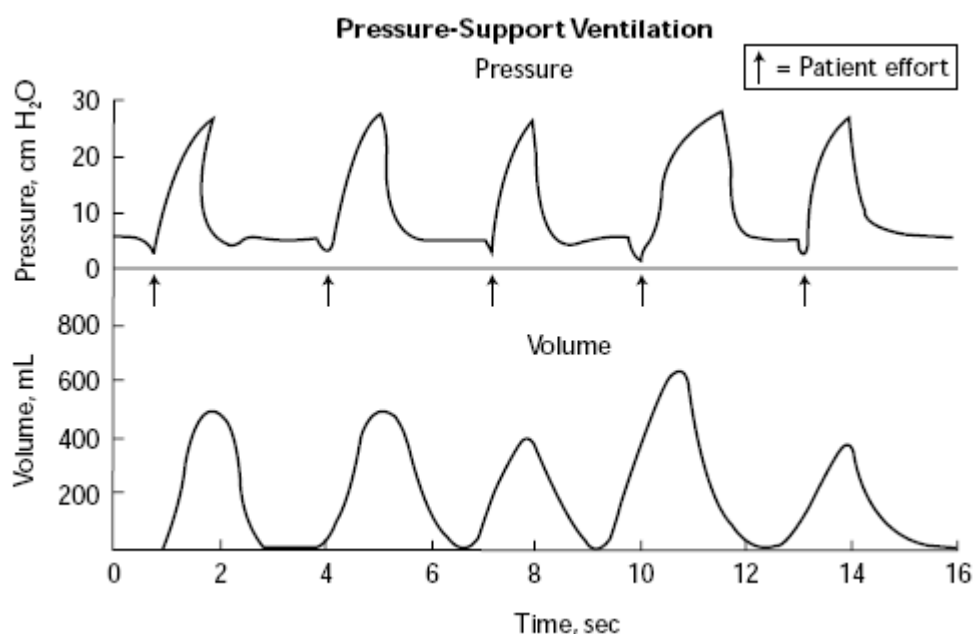


Figura 03 – Curvas de pressão e volume durante a ventilação por pressão de suporte (PSV). Notar que cada ciclo ventilatório é ativado pelo esforço do paciente. Os ciclos variam em volume corrente e tempo inspiratório de acordo com a intensidade do esforço (HOWMAN, 1999).

Apesar dos inúmeros benefícios e avanços no cuidado de pacientes críticos, a utilização da AVM pode acarretar múltiplas complicações, principalmente quando utilizada por um longo período de tempo. A AVM prolongada caracteriza-se pela dependência do ventilador num período maior que 48 horas (CHANG et al, 2005; FERRER et al, 2002; ARMANDO et al, 2005; CHIANG et al, 2006).

Estas complicações inerentes à AVM prolongada são de origem multifatorial. A imobilidade no leito, a desordem do quadro clínico, os procedimentos cirúrgicos, o déficit

nutricional e a exposição a agentes farmacológicos podem afetar adversamente o estado funcional e resultar em maior período de internação e intubação orotraqueal (MADOR et al, 2004; SIMONE et al, 2004; MADOR et al, 2005; MARTIN et al, 2005). Muitos desses fatores também aumentam a probabilidade dos pacientes submetidos à AVM prolongada de desenvolverem polineuropatia do paciente crítico, com prejuízos significativos ao sistema neuro-músculo-esquelético (JUNIOR; AMARAL, 2002; DOURADO; GODOY, 2004).

Alguns fatores podem prolongar a permanência do paciente na ventilação mecânica, dentre eles, o ritmo de trabalho ininterrupto desenvolvido nas UTIs e o uso de dispositivos desconhecidos, provocando medo e ansiedade. Causas de ansiedade e agitação psicomotora se devem a relativa imobilidade que alguns sistemas sensíveis de monitorização exigem, além dos limites impostos pelas enfermidades graves complicando ainda mais o quadro clínico do paciente (JUNIOR; AMARAL, 2002. BENSENOR; CICARELLI, 2003).

Logo, a sedação torna-se parte integral da rotina da UTI por reduzir o desconforto e a ansiedade associados a este ambiente, promover amnésia de eventos desagradáveis, aumentar à tolerância ao suporte ventilatório e facilitar os cuidados de rotina (BESNOR et al, 2004). Alguns estudos demonstraram que, em diversas instituições, 40% dos pacientes sob cuidados intensivos receberam drogas sedativas, sendo a adaptação da ventilação mecânica a principal indicação de sedação, contabilizando 57,73% de todas as circunstâncias para as quais foram administrados os sedativos (BENSENOR; CICARELLI, 2003). Dependendo do grau de sedação inserido, o indivíduo pode apresentar diminuição ou ausência do nível de consciência, ficando restrito ao leito (SLULLITEL et al, 1998).

O sistema músculo esquelético é geralmente o mais acometido pelo imobilismo, o que resulta em perda de massa muscular e atrofia, em decorrência da diminuição do número de proteínas na miofibrila por área de secção transversa que proporciona, conseqüentemente, a perda das fibras musculares, acarretando significativa redução da força muscular num período de quatro a seis semanas (POWERS et al, 2002; SASSOON et al, 2002; SHANELY et al, 2002; VOJVODIC, 2004). Com seis horas de imobilização completa já se observa diminuição na síntese protéica assim como diminuição no número de sarcômeros, atrofia das fibras musculares tipo I e II e redução do torque (VOJVODIC, 2004). Para cada semana de imobilização completa no leito um paciente pode perder de 10 a 20% de seu nível inicial de força muscular (VOJVODIC, 2004). Assim, o tempo de imobilidade refletirá a gravidade da disfunção contrátil pelas mudanças nas propriedades intrínsecas das fibras musculares (SASSOON et al, 2004).

Com relação aos músculos respiratórios, a imobilidade em decorrência do ventilador mecânico pode assumir uma proporção maior do trabalho respiratório, se não total, diminuindo o stress fisiológico da ventilação espontânea, o que pode acarretar a ausência completa ou parcial da ativação neural e mecânica muscular (SASSOON et al, 2004).

Vários estudos postulam que esta disfunção muscular induzida pelo ventilador não ocorre devido à anestesia, à infecção ou aos distúrbios do potencial hidrogeniônico (pH), e sim devido à mudanças intrínsecas dentro das fibras musculares como a atrofia por desuso decorrente da ventilação mecânica controlada (VMC) (POWERS et al, 2002). Shanely et al (2002), relataram que todas as fibras musculares esqueléticas do sistema locomotor sofriam atrofia, devido ao desuso conseqüente ao uso da ventilação mecânica. Esta atrofia instalava-se rapidamente em maior extensão no diafragma durante a VMC quando comparada àquela observada nos músculos periféricos, apesar desses também apresentarem-se inativos (VASSILAKOPOULOS; PETROF, 2004). Jonghe et al (2007), estudando a fraqueza respiratória e de membros em 116 pacientes sob cuidados críticos em desmame, observaram alterações neuromusculares variáveis no músculo respiratório correlacionando-as com a fraqueza muscular periférica.

Teoricamente este déficit de força pode estar ligado a um ou diversos mecanismos diferentes. A redução da síntese protéica, acarretando diminuição na concentração de proteínas da miofibrila, anormalidades em proteínas contráteis ou citoesqueléticas, com prejuízo no acoplamento das fases de excitação-contração, podem individualmente ou coletivamente contribuir nessa situação (KU et al, 1995. POWERS et al, 2002. NILSESTUEN; HARGETT, 2005). Estudos revelaram que estes eventos podem estar relacionados à elevação de proteases e aumento do estresse oxidativo associados à AVM (POWERS et al, 2002. SHANELY et al, 2002. ZERGEROGLU, 2003). Segundo Shanely et al (2002), os mecanismos responsáveis pela atrofia por oxidação de proteínas continuam desconhecidos e são considerados alvos de experiências que descrevem a proteólise como principal responsável, devido à elevada atividade de proteases.

O aumento da atividade proteolítica foi estudado utilizando-se diafragmas de ratos após 18 horas de VMC. Os três sistemas proteolíticos mais ativados com a VMC são a protease lisossomal, a calpaína e o proteossomo. A calpaína não degrada inteiramente, mas danifica parcialmente proteínas, que as substituem deixando-as vulneráveis para a atividade proteossômica. O 26S proteossomo degrada proteínas em um processo mediado pela ubiquitina, responsável pela atrofia muscular em diversos estados. O complexo 20S

proteossomo é especializado na degradação de proteínas oxidativas, por reagir com o oxigênio sem necessidade de conjugação com a ubiquitina ou hidrólise da adenosina trifosfato (ATP). Estudos em ratos descrevem que a VMC aumenta em 500% a atividade da 20S proteossomo. (VASSILAKOPOULOS; PETROF, 2004)

O estresse oxidativo no diafragma revela-se pela oxidação aumentada de proteínas e lipídios, produtos da peroxidação. O início das modificações oxidativas se dá rapidamente, ocorrendo dentro de seis horas da instituição da VMC. O estresse oxidativo aumentado foi observado também após o desuso de grupos musculares dos membros, onde o processo de imobilização ocorre por um período mais longo (VASSILAKOPOULOS; PETROF, 2004). É fato que um número considerável de proteínas críticas envolvidas no acoplamento da excitação-contração e na geração da força muscular, estão predispostas a modificações estruturais devido ao efeito oxidativo (VASSILAKOPOULOS; PETROF, 2004).

Outro fator que pode contribuir para diminuição da força muscular induzida pela ventilação mecânica prolongada pode estar relacionada às anormalidades intrínsecas na estrutura e função das proteínas contráteis e citoesqueléticas (KU, 1995; POWERS et al, 2002). Embora alguns estudos preliminares demonstrem que as contrações do diafragma não ocorrem durante a VMC, não se pode eliminar a possibilidade de um esforço inspiratório ocasional, principalmente nos casos de assincronia paciente-ventilador. Este tipo de contração pode resultar em lesão muscular e, conseqüentemente, redução da força muscular (POWERS et al, 2002. NILSESTUEN; HARGETT, 2005).

Um mecanismo potencial importante que deve ser destacado é o déficit de força muscular decorrente de alterações no acoplamento dentro do complexo excitação-contração. Por exemplo, uma redução na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e na sensibilidade da miofibrila ao cálcio estão associados à redução da força muscular (POWERS et al, 2002).

Além da perda das proteínas miofibrilares, expansão da matriz extracelular, e alterações metabólicas enzimáticas (DIFFEE, 1991; POWERS, 2005; TSIKA, 1987), o desuso prolongado dos músculos esqueléticos resultam em perda seletiva de mionúcleos (ALLEN et al, 1997; DUPONT-VERSTEEGDEN, 2006; HIKIDA et al, 1997; PRIMEAU, 2002; SANDRI, 2002). A perda mionuclear pode ser considerada uma via alternativa usada pela fibra muscular para manter constante a taxa de volume miofibrilar citoplasmático por mionúcleo (isto é, o domínio mionuclear) (SANDRI, 2002). A significância biológica do domínio mionuclear é baseada na teoria que um único núcleo pode sustentar a expressão

gênica necessária para uma determinada área do citoplasma. Essa noção é apoiada pelas observações que novos núcleos são incorporados nas fibras musculares esqueléticas durante o crescimento e que esses núcleos são perdidos durante o processo atrofico (ALLEN et al, 1997; HIKIDA et al, 1997; SANDRI, 2002). Embora seja conhecido que a ventilação mecânica controlada diminui a síntese de proteínas, induz a proteólise e provoca atrofia de todos os tipos de fibras musculares (SHANELY, 2002; SHANELY, 2004; ZERGEROGLU, 2003), ainda é desconhecido se o domínio mionuclear das fibras musculares diafragmáticas é alterado durante a atrofia associada à ventilação mecânica, e se o modo PSV pode atenuar os efeitos deletérios causados por modos controlados, como o PCV.

A atrofia dos músculos respiratórios e significativa disfunção contrátil com redução da força e da resistência dos músculos respiratórios prejudicam substancialmente o processo de desmame desses pacientes submetidos à AVM controlada por período prolongado (POWERS et al, 2002. CHIANG et al, 2006. ZERGEROGLU, 2003).

3 Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Animais e desenho do estudo

A amostra foi formada por 18 ratos machos albinos da linhagem *Wistar*, com idade de 120 dias, pesando entre 300 – 350g, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os procedimentos experimentais com os animais estiveram de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), obedecendo às normas de manuseio e cuidado com os animais (protocolo nº 23076.012736/2008-16), e os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Anexo II).

Para favorecer uma expressão comportamental mais condizente com o ciclo natural de vigília do rato, um animal notívago, os animais foram mantidos em um biotério com ciclo claro-escuro invertido, num ciclo de luz (21:00 às 9:00 h) e escuridão (09:00 às 21:00h) constante e temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por um período de 1 semana antes dos experimentos.

Para adaptação ao ciclo invertido de luz, fêmeas matrizes e machos reprodutores foram transferidos para este biotério com antecedência de duas semanas em relação ao acasalamento, para permitir uma adaptação do ciclo cronobiológico e evitar a interferência de fatores estressantes sobre o ciclo estral das ratas. O acasalamento foi realizado com ratos de idade entre 90 e 120 dias na proporção de um macho para duas fêmeas. O diagnóstico da prenhez foi feito através da aferição do peso corporal a cada três dias. Confirmado o estado de prenhez, as ratas foram separadas dos machos e alojadas individualmente em gaiolas-maternidades.

Para constituir os grupos experimentais, foram utilizados 18 animais com idade de 120 dias, agrupados de forma aleatória, em quantidades iguais (n=6), nos seguintes grupos: 1) Respiração espontânea (RE), 2) AVM controlada (PCV-C) e 3) AVM com Pressão de Suporte (PSV), de acordo com a Figura 04.

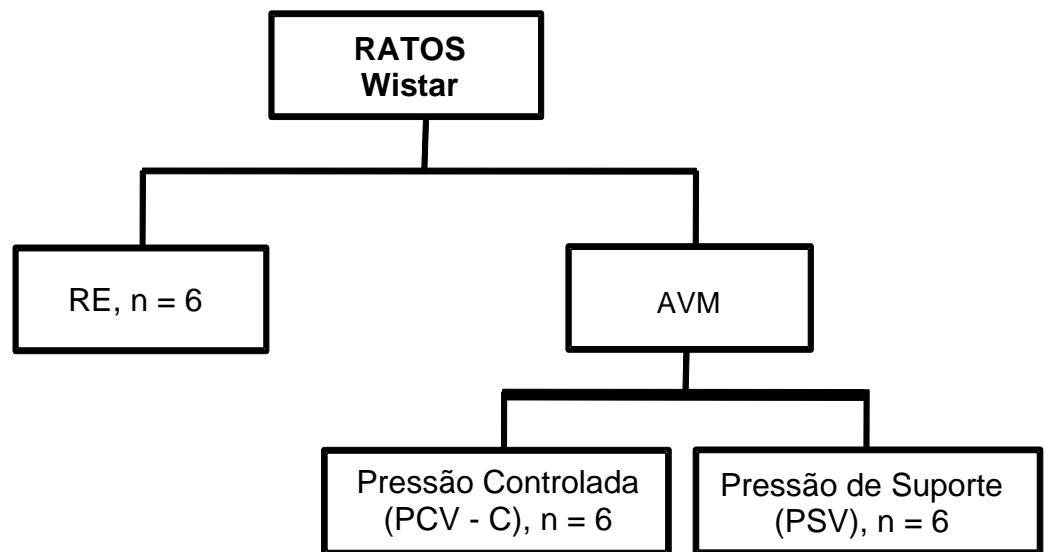


Figura 04 – Organograma representando a distribuição do número de animais, com idade de 120 dias, da linhagem Wistar, em Respiração espontânea (RE), Pressão Controlada (PCV-C) e Pressão de Suporte (PSV), formando os grupos experimentais, com 6 animais em cada grupo.

3.2 Preparo dos animais

Os ratos foram sedados com diazepam (5 mg, i.p.) e anestesiados com tiopental sódico (20 mg/kg, i.p.). Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico, em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados com esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos estendidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores abduzidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada uma pequena incisão longitudinal mediana de aproximadamente 2 cm de extensão na face ventral do pescoço dos animais seguida de divulsão dos tecidos até a exposição completa do terço inicial da traquéia. A seguir, pela traqueostomia, uma cânula de polietileno com 1,0 mm diâmetro interno (DI) e 3 cm de comprimento foi introduzida na traquéia, sendo esta fixada na porção proximal da traquéia por meio de fios de algodão (Figuras 05 e 06).



Figura 05 – Rato em decúbito dorsal, sendo submetido à droga anestésica e sedativa, por via intraperitoneal.

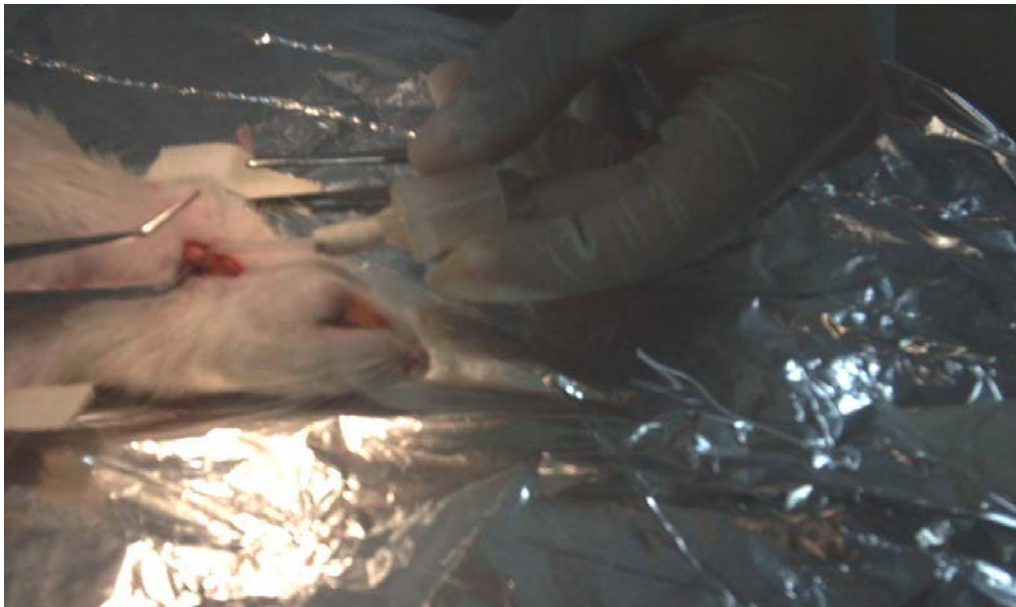


Figura 06 – Rato em decúbito dorsal, membros fixados com esparadrapo, após administração da droga anestésica e sedativa. Nota-se pequena incisão na porção proximal da traquéia, para introdução da cânula de traqueostomia, que encontra-se na mão do pesquisador.

3.3 Grupos experimentais

Grupo respiração espontânea (RE): Este grupo foi composto de ratos que se submeteram ao procedimento cirúrgico e permaneceram respirando espontaneamente por um período de 6 horas, sendo logo após eutanasiados.

Grupo assistência ventilatória mecânica controlada (PCV-C): Este grupo foi composto de ratos ventilados mecanicamente no modo de ventilação por pressão controlada num período de 6 horas através do ventilador Inter 5 Plus Ventilator (INTERMED, KESA, Pernambuco, BRASIL) com disparo a tempo, pressão limitada, utilizando circuitos neonatais, com umidificação do ar inspirado. A pressão inspiratória foi ajustada de forma a liberar um volume corrente (VC) de 8 – 10 mL/Kg. A frequência respiratória foi ajustada alta o suficiente para suprimir a atividade elétrica diafragmática, o que foi atingido numa faixa de 80 – 90 incursões respiratórias/min. A pressão positiva expiratória final (*positive end expiratory pressure* – PEEP) foi colocada em 5cmH₂O, e a fração inspirada de oxigênio (FiO₂) foi ajustada de forma a manter a PaO₂ > 60 Torr. Os animais foram sacrificados após as seis horas de AVM controlada.

Grupo AVM com pressão de suporte (PSV): Este grupo recebeu seis horas de AVM no modo PSV através do ventilador Inter 5 Plus Ventilator (INTERMED, KESA, Pernambuco, BRASIL) com disparo à pressão, pressão limitada, utilizando circuitos neonatais, com umidificação do ar inspirado. A pressão de suporte foi ajustada de forma a liberar um volume corrente (VC) de 8-10 mL/Kg, a pressão positiva expiratória final (*positive end expiratory pressure* – PEEP) foi colocada em 5cmH₂O e a fração inspirada de oxigênio (FiO₂) foi ajustada de forma a manter a PaO₂ > 60 Torr. Os animais foram eutanasiados após 6 horas de AVM no modo PSV.

3.4 Monitorização Animal e Cuidados durante a Ventilação Mecânica

Durante a AVM, foi administrada sedação com diazepam (5mg/Kg i.p) de acordo com a movimentação periférica do animal. A dose do diazepam foi administrada de forma a não suprimir o centro respiratório. Isto era avaliado pela avaliação da frequência respiratória (FR),

com o rato desconectado à AVM, após a administração do medicamento. Caso a FR se mantivesse em valores esperados para o animal (70-90 ipm), a dose encontrava-se correta. No grupo de AVM controlada, a supressão da atividade diafragmática foi realizada pelo ajuste dos parâmetros ventilatórios. Primariamente a FR era pré-ajustada em 80ipm. Caso o rato apresentasse sinais de atividade diafragmática, monitorizados através das curvas de pressão de vias aéreas e fluxo no display do ventilador, aumentava-se a pressão de pico, de forma a aumentar o volume corrente e, assim, deprimir o centro respiratório. Somado a isto, a pressão de vias aéreas, o VC, e os sinais de fluxo foram monitorizados através do display do ventilador. Cuidados contínuos com os animais eram realizados, como esvaziamento vesical, lubrificação dos olhos e movimentos passivos dos membros. Para prevenção de atelectasia, os pulmões foram insuflados com uma pressão inspiratória (PCV-C) ou de suporte (PSV) para produzir uma volume de 15mL/kg por cinco incursões respiratórias consecutivas a cada 15 minutos em todos os animais, exceto, os que estavam em RE. Os estiramentos passivos não foram causa determinante de adaptação morfológica da inativação diafragmática, segundo trabalho anterior (ZAHN, 1995).

3.5 Análise Histológica e Morfométrica

Após seis horas de via aérea artificial, sendo respiração espontânea para o grupo controle (RE) e AVM para os demais grupos, todos os animais foram sacrificados através de uma hemorragia maciça por secção da aorta abdominal e da veia cava inferior. Em seguida, foi realizada biópsia muscular aberta da região médio-costal desde a margem costal até o tendão central do músculo diafragma direito. Não houve infiltração anestésica do músculo a ser retirado (Figura 07).



Figura 07 – Após 6 horas nos grupos estudados, o rato era eutanasiado e realizado uma secção transversa do animal, para retirada do diafragma costal direito (seta preta).

O fragmento muscular retirado foi imediatamente disposto sobre placa de cortiça, sendo posicionado de tal forma, que o seu maior diâmetro (sentido das fibras musculares) foi mantido perpendicular à cortiça para obtenção de cortes transversais. Após este procedimento, o fragmento foi por inteiro coberto com talco (Equate, Wal-Mart Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), o qual funciona como isolante térmico e, logo em seguida, imerso em nitrogênio líquido (-180°C) por 20 a 25 segundos, sendo então retirado e armazenado num freezer a -80°C , em recipiente numerado, para posteriormente ser seccionado em criostato à -23°C .

Os cortes obtidos foram de $\pm 10\ \mu\text{m}$ de espessura, utilizando-se um criostato de bancada (Leica, modelo CM 1100, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Alemanha) do setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Esses foram iniciados, padronizando-se o lado em que o músculo foi cortado pela navalha, desprezando-se assim, os três primeiros cortes para eliminar qualquer interferência que tenha ocorrido pelo corte da navalha. Os cortes seqüenciais foram corados com Hematoxilina – Eosina (HE), de acordo com o protocolo do laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, e aderidos às lâminas de forma sucessiva, até completar um total de quatro fragmentos por preparação, sendo os mesmos dispostos, lado a lado, em lâminas com tarjas foscas. Para um controle maior, adotou-se que o primeiro corte fosse colocado como referencial, próximo à parte fosca.

Essas preparações foram avaliadas quanto ao estudo morfométrico, para uma maior compreensão dos tipos de fibras musculares comprometidas. A análise morfométrica das

fibras musculares foi realizada por intermédio de um sistema de captação de imagens semi-automático composto dos seguintes instrumentos: um microscópio ZEISS (modelo AXIOLAB, USA) acoplado a uma câmera digital (Sony, Japão), conectada a um computador Pentium III 2.0; com placa de captura de imagens (ATI) e software (IMAGE – LAB 2000), pertencente ao setor de Histologia e Análise de Imagens do Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Farmácia – C.C.S./UFPE.

Foram analisadas três preparações (coradas com HE) de cada rato estudado, sendo que cada preparação apresentava quatro fragmentos e de cada fragmento foram analisados 5 campos e contadas 3 fibras por campo, totalizando 60 fibras por preparação. Visto que foram três preparações por cada animal, totalizou-se a análise de 180 fibras musculares em cada rato e de 1080 fibras nos seis ratos de cada grupo.

Os parâmetros analisados foram os seguintes: área (A) e diâmetro menor (d) das fibras musculares do diafragma direito. Além desses, a área e o perímetro dos núcleos das fibras musculares foram obtidos pela análise microscópica no aumento de 1000X, com a utilização de óleo de imersão.

3.6 Análise Estatística

As variáveis quantitativas foram expressas em médias e desvios-padrão. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança. O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para as variáveis quantitativas. Quando comparados os modos ventilatórios PCV-C e PSV com o RE foi utilizado o teste ANOVA (quando distribuição normal) e o teste de Kruskal-Wallis (quando distribuição não normal). Quando o nível de significância pré-estabelecido de 5% foi atingido no teste ANOVA, foi utilizado o *pos-hoc* de Tukey. Na análise entre dois grupos (PCV-C x RE; PCV-C x PSV; PSV x RE), quando distribuição não normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

4 RESULTADOS

*Artigo Original: Effects of
Controlled Mechanical
Ventilation and Pressure
Support Ventilation on
diaphragm muscle of rats*

4 RESULTADOS

Artigo Original

TÍTULO: EFFECTS OF CONTROLLED MECHANICAL VENTILATION AND PRESSURE SUPPORT VENTILATION ON DIAPHRAGM MUSCLE OF RATS
PERIÓDICO: RESPIRATORY MEDICINE
EDITORIA: ELSEVIER
QUALIFICAÇÃO: Qualis – B1
ÁREA: Medicina II

EFFECTS OF CONTROLLED MECHANICAL VENTILATION AND PRESSURE SUPPORT VENTILATION ON DIAPHRAGM MUSCLE OF RATS.

Running title: Effects of CMV and PSV in Diaphragm Muscle of Rats

André de Sá Braga Oliveira¹, Lívia Bandeira Costa¹, Paloma Lys de Medeiros^{1,2}, Diógenes Luís da Mota², Eduardo Ériko França³, Indianara Maria Araújo do Nascimento⁴.

¹Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, Brasil.

²Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, Brasil.

³Departamento de Fisioterapia da Universidade Católica de Pernambuco.

⁴Departamento de Fisioterapia da Faculdade Integrada de Recife.

Corresponding author: André de Sá Braga Oliveira, Programa de Pós-graduação em Patologia (UFPE). Cidade Universitária, S/N. Recife-Pernambuco, Brazil. CEP: 50.670-901. Phone: +55.81.21268515. Fax: +55.81.21268529. E-mail: andre.sboliveira@gmail.com

EFFECTS OF CONTROLLED MECHANICAL VENTILATION AND PRESSURE SUPPORT VENTILATION IN RAT DIAPHRAGM MUSCLE.**ABSTRACT**

Controlled mechanical ventilation (CMV) induces many modifications in diaphragm function and biology, called Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction (VIDD). These modifications may be attenuated by using assisted modes of mechanical ventilation, like Pressure Support Ventilation (PSV). The objective of this study was to analyze the effects of Pressure Controlled Ventilation mode (PCV-C) and PSV mode in diaphragm muscle of rats. Wistar rats (n=18) were randomly assigned to the control group or to receive 6 hours of PCV and PSV. After this period, animals were sacrificed and their diaphragms were excised, frozen in liquid nitrogen and stored in a -80° C freezer for further histomorphometric analysis. Results showed a 15% decrease in cross-sectional area of muscle fibers on the PCV-C group when compared to the control group ($p<0.001$) and by 10% when compared to the PSV group ($p<0.05$). Minor diameter was decreased in PCV-C group by 9% when compared with the control group ($p<0.001$) and by 6% when compared to the PSV group ($p<0.05$). When myonuclear area was analyzed, a 16% decrease was observed in the PCV-C group when compared to the PSV group ($p<0.05$). No significant difference between the groups was observed in myonuclear perimeter ($p>0.05$). Short-term controlled mechanical ventilation seems to lead to muscular atrophy in diaphragm fibers. The PSV mode may attenuate the effects of VIDD, and might be an important alternative to the control of muscular atrophy due to ventilatory support.

Key-words: diaphragm, controlled mechanical ventilation, pressure support, rats.

INTRODUCTION

Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction (VIDD) is characterized by a reduction in diaphragm force generation capacity due to controlled mechanical ventilation (CMV) and was recently shown to occur in humans¹, being well-recognized in animal models as well, like rats^{2,3}, rabbits⁴, piglets⁵, and baboons⁶. In rats, VIDD develops rapidly, as early as 12 h after the institution of CMV⁷.

This dysfunction has been implicated in weaning failure^{8,9}. Although weaning failure may be due to numerous factors, VIDD probably plays an important role.

Currently, underlying mechanisms responsible for such phenomenon have not been fully elucidated. Studies demonstrated the following alterations in the diaphragm after controlled mechanical ventilation: reduced muscle mass^{2,10,11}; diminished type I, IIa, and IIx/b fiber dimensions^{3,12,13}; myofibrillar damage⁴; enhanced proteolysis¹²; increased protein oxidation and lipid peroxidation¹⁴; reduced expression of the insulin-like growth factor (IGF-I)³; decreased sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ATPase (SERCA-1a) expression¹⁵; increased expression of muscle atrophy factor (MAF-box)¹⁶; and a decrease in myonuclear content¹⁷. All of these factors seem to contribute to the development of VIDD, but the precise contribution of each factor and their apparition kinetics has yet to be defined.

Muscle atrophy and myonuclear loss are important factors in the development of VIDD. The decreased volume of the cytoplasm (atrophy) was observed in the presence of decreased number of myonuclei, although the myonuclear domain (the concept that each myonucleus controls the gene products in a finite volume of a muscle fiber¹⁷) remained constant. This decrease in myonuclear content was mediated by caspase-3-dependent increased apoptosis, which was evident as early as 6 hours after the onset of CMV⁷. Both the apoptosis and the atrophy were attenuated by the inhibition of caspase-3⁷.

Although CMV can be too harmful to diaphragm muscle fibers, few studies have been developed aiming VIDD prevention^{16,18,19}. Maybe diaphragmatic dysfunction could be decreased by spontaneous breathing. Pressure support ventilation has already proved to be efficient in patients with chronic obstructive pulmonary disease and acute respiratory failure²⁰⁻²². We hypothesized that CMV would reduce morphometric parameters of muscle fibers and myonuclei, and PSV, which preserves respiratory muscle activity, would induce less diaphragmatic atrophy.

METHODS

Animals and experimental design

This study was performed in accordance with the recommendations of Brazilian College of Animal Experimentation and Animal Care Comitee of Federal University of Pernambuco (Protocol number 23076.012736/2008-16).

Eighteen Wistar rats (approximately 320g) were individually housed and fed rat chow and water ad libitum and were maintained on a 12-hour light/dark cycle for one week before initiation of these experiments. Animals were assigned to 6 hours of spontaneous breathing (SB) or mechanical ventilation on the PCV-C or the PSV mode with 21% O₂ (Figure 1). All surgical procedures were performed using aseptic techniques. After reaching a surgical plane of anesthesia (sodium thiopental, 20 mg/kg of body weight, intraperitoneal) and sedation (diazepam, 5mg/kg body weight, intraperitoneal), animals were weighed and tracheostomized. Body temperature was monitored (rectal thermometer) and maintained at 37°C ±1°C with a recirculating heating blanket. Continuing care during the experimental period included expressing the bladder, eyes lubrication and passive movements of the limbs. Airway pressure, tidal volume and flow signals were monitored by the ventilator display. To prevent atelectasis, lungs in the PCV-C and PSV groups were inflated in a tidal volume of 15mL/kg for five consecutive breathings for 15 min during the 6 hours of experiment.

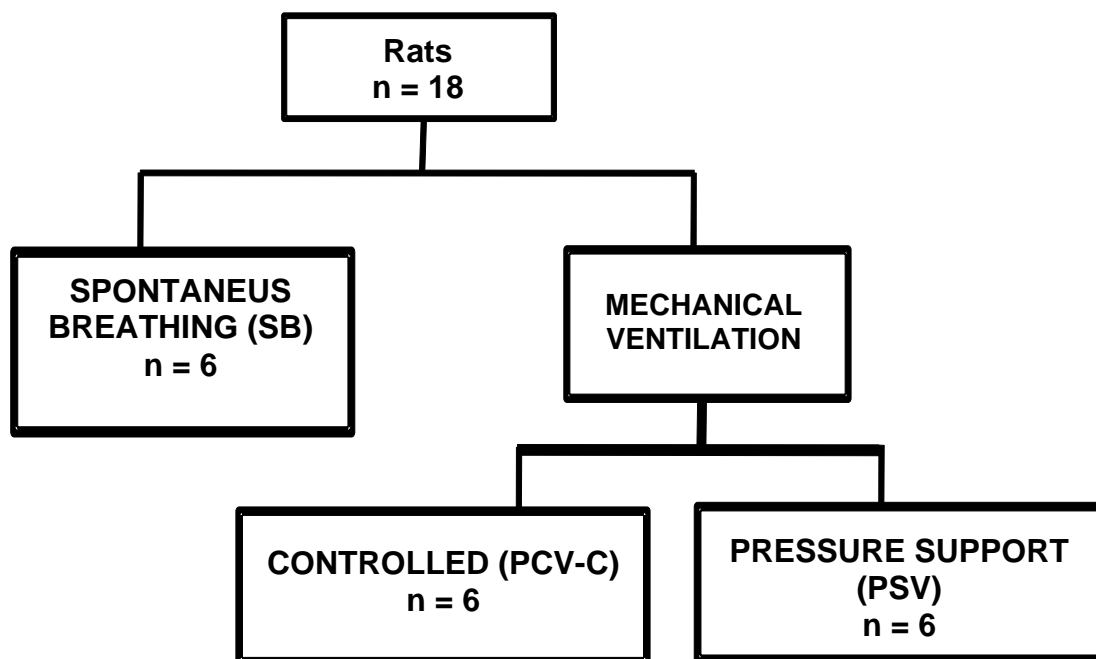


Figure 1 – Schematic illustration of the experimental design used. All groups were assigned for 6 hours of SB or MV on PCV-C or PSV modes.

Protocol for Controlled Mechanical Ventilation group (PCV-C)

After surgical procedures, animals were mechanically ventilated using a pressure-driven ventilator (Inter 5 Plus Ventilator, Intermed, KESA, Pernambuco, Brazil) in PCV (Pressure-Controlled Ventilation) mode for 6 hours. The tidal volume was 10mL/kg body weight and the respiratory rate was 80 breaths per minute, with a fraction of inspired oxygen (FiO₂) of 21%, and positive end-expiratory pressure of 5 cmH₂O. These ventilator conditions resulted in complete diaphragmatic inactivity and prevented noxious effects of hypercapnia on the muscular contractile properties^{4,10,12}. At the end of 6 hours, each animal was weighed, and the right costal diaphragm was rapidly removed, dissected and frozen in liquid nitrogen at -180° C. Samples were stored at -80° C in a freezer until histological and morphometric analysis.

Protocol for Pressure Support Ventilation group (PSV)

After surgical procedures, animals were mechanically ventilated using a pressure-driven ventilator (Inter 5 Plus Ventilator, Intermed, KESA, Pernambuco, Brazil) in PSV mode for 6 hours. The level of pressure support applied, determined during preliminary studies, allowed a minute volume of approximately 245 mL/minute (respiratory rate of approximately 70 breaths per minute and $FiO_2 = 21\%$). The range of pressure support level used was 5 – 8cmH₂O. The ventilator had a flow trigger. The expiratory trigger was 25% of peak inspiratory flow, and the maximum inspiratory time was set at 1 second. The ventilator had a backup ventilation, but it was not used during the experiments. If the animal was not triggering, no pressure was released. Continuing care during the experiment was also applied as above. At the end of 6 hours, each animal was weighed, and the right costal diaphragm was rapidly removed, dissected and frozen in liquid nitrogen at -180° C. Samples were stored at -80° C for further histological and morphometric analysis.

Protocol for Spontaneous Breathing group (SB)

Control animals (SB) were free of mechanical ventilation intervention. These animals were submitted to the drugs mentioned above, tracheostomized, and were maintained with continuing care as the other groups until the end of the experimental period (6 hours). Then, their diaphragms were rapidly removed, dissected and frozen in liquid nitrogen at -180° C. Samples were stored at -80° C.

Histological and histomorphometric analysis

After six hours of mechanical ventilation in the PCV-C and the PSV group, and spontaneous breathing in the SB group, all animals were sacrificed with large hemorrhage by abdominal aortic and inferior vena cava section. Right costal diaphragm was removed,

dissected and weighed. Samples were fixed to a cork holder with their fibers oriented perpendicularly to the surface, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Serial cross-sections parallel to the cork were done ($10\mu\text{m}$) with cryostat (Leica, modelo CM 1100, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Germany) at -23°C and stained with hematoxylin and eosin. Qualitative examination of these slides was performed by an expert who was not aware of the experimental design of the study. Quantitative examination was realized by computadorized semiautomatic system and Image-lab 2000 software. The parameters evaluated were area and minor diameter of the muscle fibers and area and perimeter of the myonuclei.

Statistical Analysis

Quantitative variables were expressed in mean \pm standard deviation. Kolmogorov-Smirnov test was applied to verify normality. Differences between the PCV-C, PSV and SB groups were tested by one-way analysis of variance (if normal), with post hoc application (Tukey) of the least significant difference test. If not normal, Mann-Whitney test was used. Statistical significance was defined *a priori* as a *P* value of less than 0.05.

RESULTS

General Findings

No significant difference between initial body weight and final body weight in the studied groups was observed (Table 1), indicating adequate hydration and nutrition during experimental period. The doses of anesthetics and sedatives were similar between groups. Only one death occurred in this study, in the PCV-C group.

Table 1: Body weight of PCV – C, PSV and SB groups

	PCV	PSV	SB
Initial body weight, g	312.33 ± 10.5	336.83 ± 8.4	335.33 ± 9.1
Final body weight, g	310.11 ± 11.8	335.45 ± 6.5	334.33 ± 7.7

Values expressed in mean ± standard deviation

Definition of abbreviations: PCV – C = Pressure controlled ventilation (controlled mechanical ventilation); PSV = Pressure Support Ventilation; SB = Spontaneous Breathing

Histological Analysis

Qualitative examination of the diaphragm sections stained with hematoxylin and eosin did not reveal any abnormalities in diaphragm histology (Figure 2 and 3). Some muscle fibers did not show myonuclei. It happened because of section plane used.

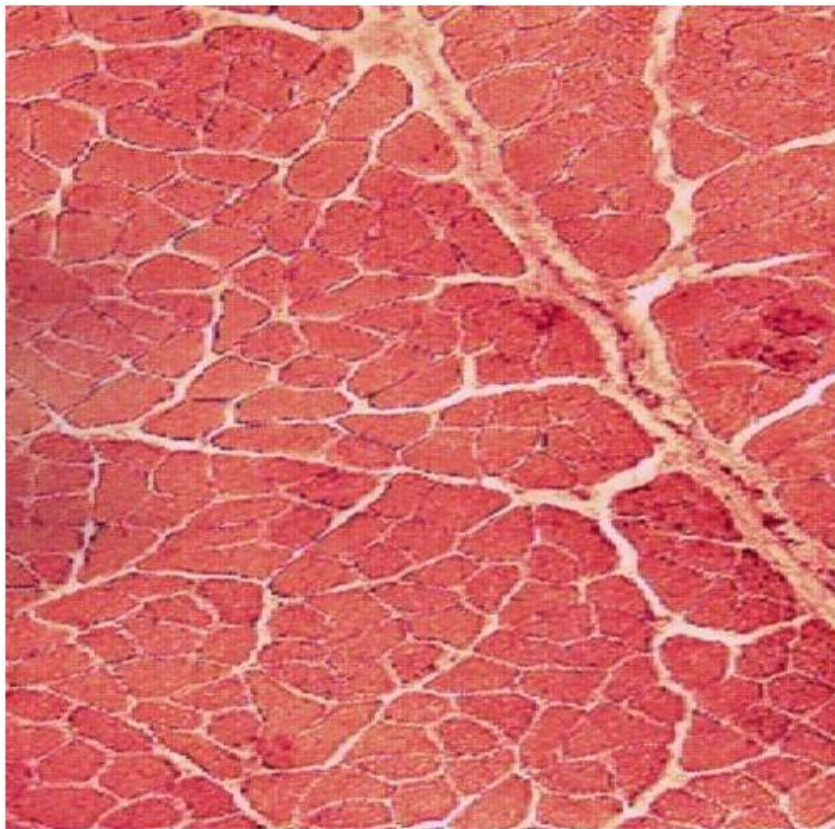


Figure 2 – Photomicrography of right diaphragm muscle of a rat in PSV mode. We observe muscle fascicles. HE staining. 100X.

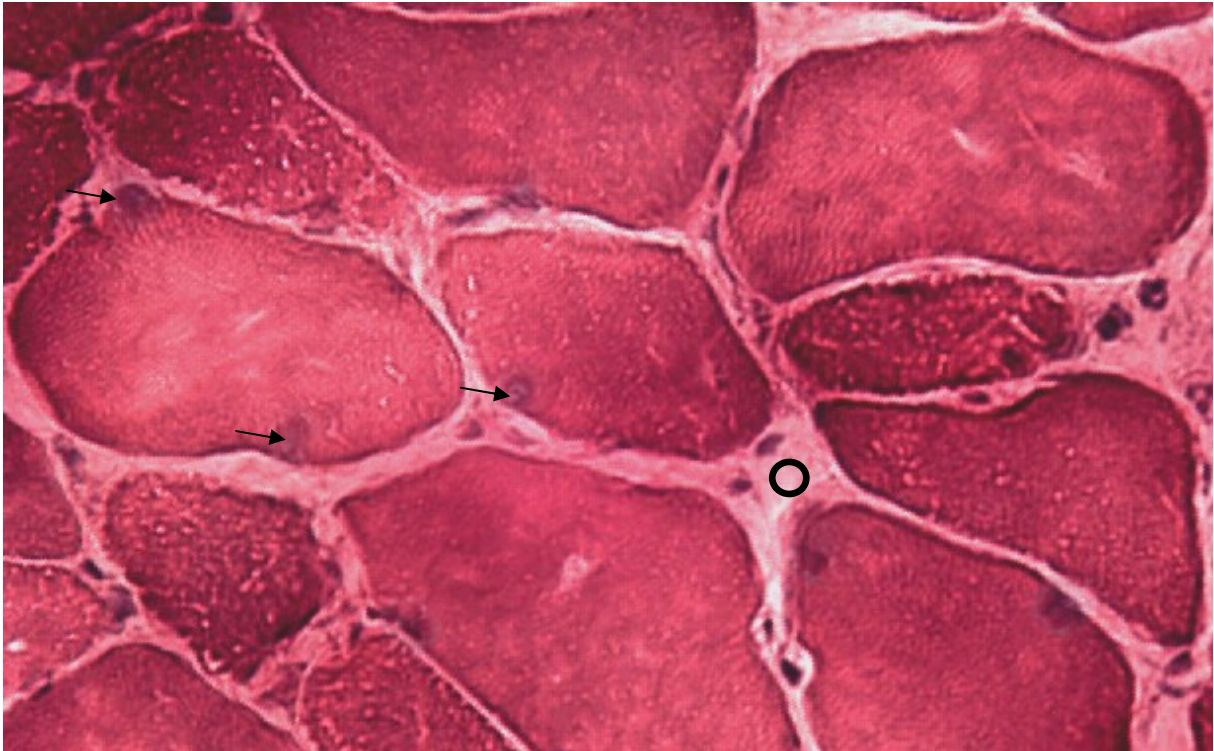


Figure 3 – Photomicrography of right diaphragm muscle of a rat in PSV mode. We observe multinucleated cells with peripheral localization (black arrows). The endomysium connective tissue is observed among muscle fibers (open circle). HE staining. 400X.

Area and minor diameter of muscle fibers

We found a significant decrease ($p < 0.001$) of muscle fibers area in the PCV-C group ($407.70 \mu\text{m}^2 \pm 198.59 \mu\text{m}^2$) when compared with the SB group ($480.75 \mu\text{m}^2 \pm 246.54 \mu\text{m}^2$) and the PSV group ($453.43 \mu\text{m}^2 \pm 215.97 \mu\text{m}^2$), with $p = 0.003$ (Figure 4).

When we analyzed minor diameter of muscle fibers, we found similar results: the PCV-C group ($18.70 \mu\text{m} \pm 5.13 \mu\text{m}$) had a significant reduction ($p < 0.001$) in minor diameter when compared to the SB group ($20.43 \mu\text{m} \pm 5.49 \mu\text{m}$), and to the PSV group ($19.89 \mu\text{m} \pm 5.32 \mu\text{m}$), with $p = 0.002$ (Figure 5).

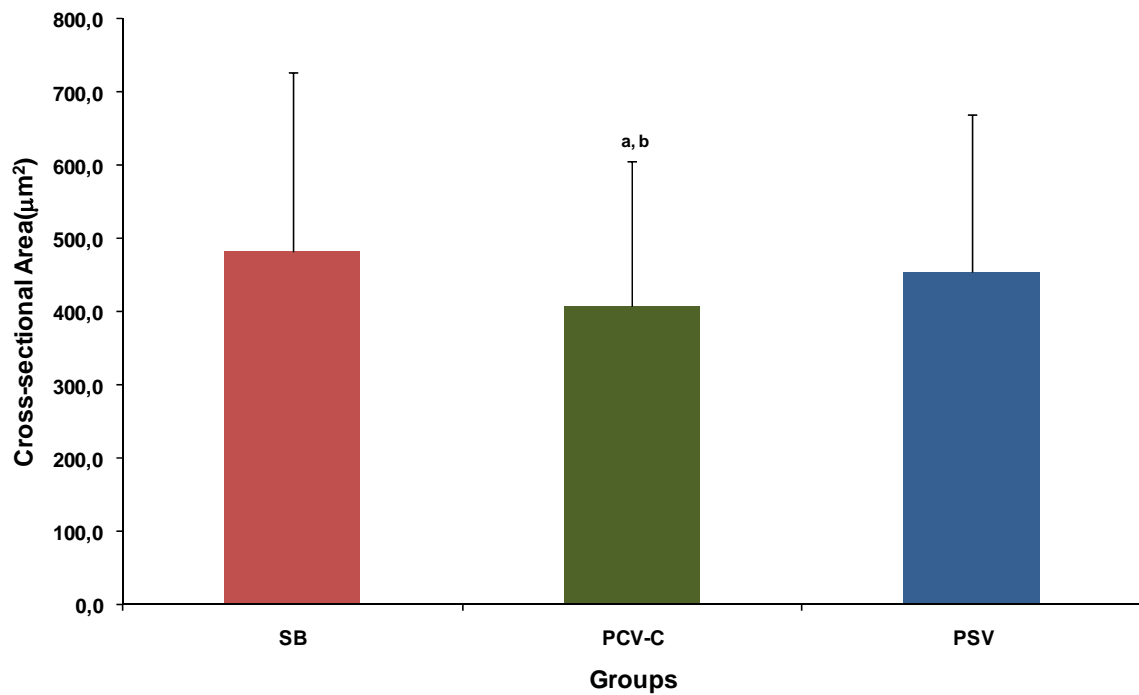


Figure 4 – Effects of controlled mechanical ventilation (PCV-C) and Pressure Support Ventilation (PSV) on rat diaphragm muscle fibers area. We observe muscle atrophy in the PCV-C group when compared to the control group (SB) and to the PSV group. Values are represented as mean \pm standard deviation. **a** ($p < 0,001$) indicates difference between the PCV-C and the SB groups; **b** ($p < 0,05$) indicates difference between the PCV-C and the PSV groups (Mann-Whitney test).

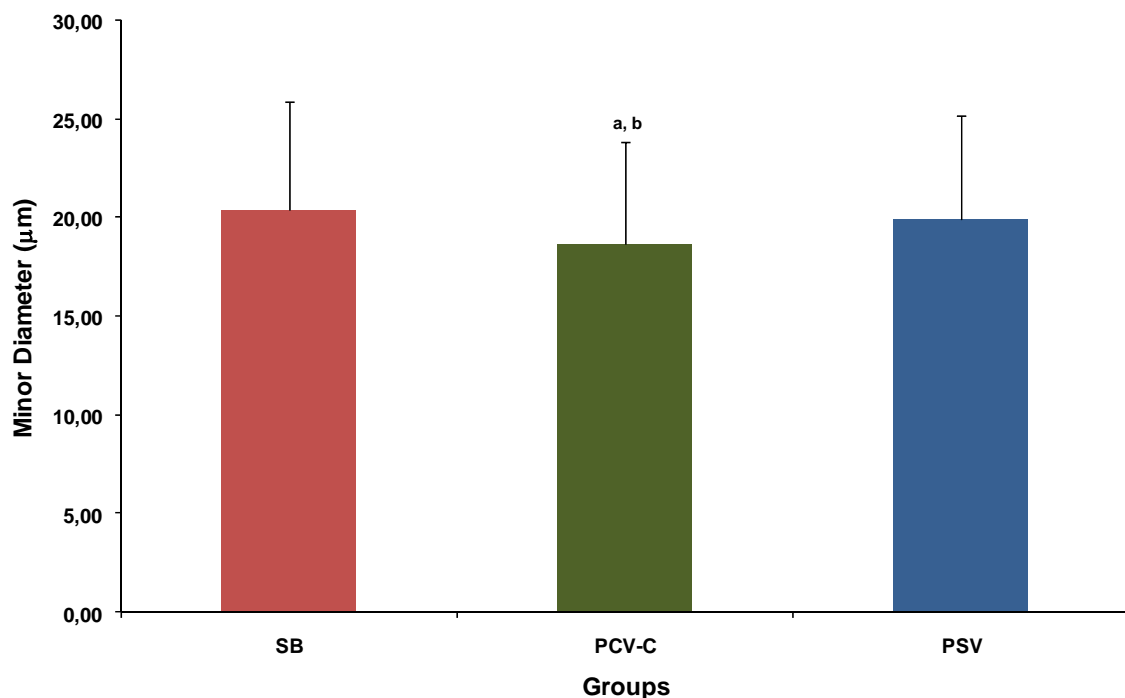


Figure 5 - Effects of controlled mechanical ventilation (PCV-C) and Pressure Support Ventilation (PSV) in rat diaphragm muscle fibers minor diameter. We observe muscle atrophy in the PCV-C group when compared to the control group (SB) and to the PSV group. Values are represented as mean \pm standard deviation. **a** ($p < 0,001$) indicates difference between PCV-C and SB groups; **b** ($p < 0,05$) indicates difference between PCV-C and PSV groups (Mann-Whitney test).

Area and perimeter of myonucleus

The PCV-C group ($2.30\mu\text{m}^2 \pm 0.80\mu\text{m}^2$) showed a reduction in myonuclei area when compared with the SB group ($2.44\mu\text{m}^2 \pm 1.05\mu\text{m}^2$), but the difference was not significant ($p=0,618$). The PSV group revealed an increase in myonuclei area ($2.73\mu\text{m}^2 \pm 0.989\mu\text{m}^2$) when compared to the control group (SB), but this difference was not significant ($p=0.056$). Significant reduction ($p=0.002$) was observed in myonuclei area of the PCV-C group when compared with the PSV group (Figure 6).

When myonuclei perimeter was analyzed, significant differences between the groups were not observed: PCV-C ($7.31\mu\text{m} \pm 1.47\mu\text{m}$), PSV ($7.49\mu\text{m} \pm 1.46\mu\text{m}$) and RE ($7.31\mu\text{m} \pm 1.68\mu\text{m}$), with p value of 0.065 (Figure 7).

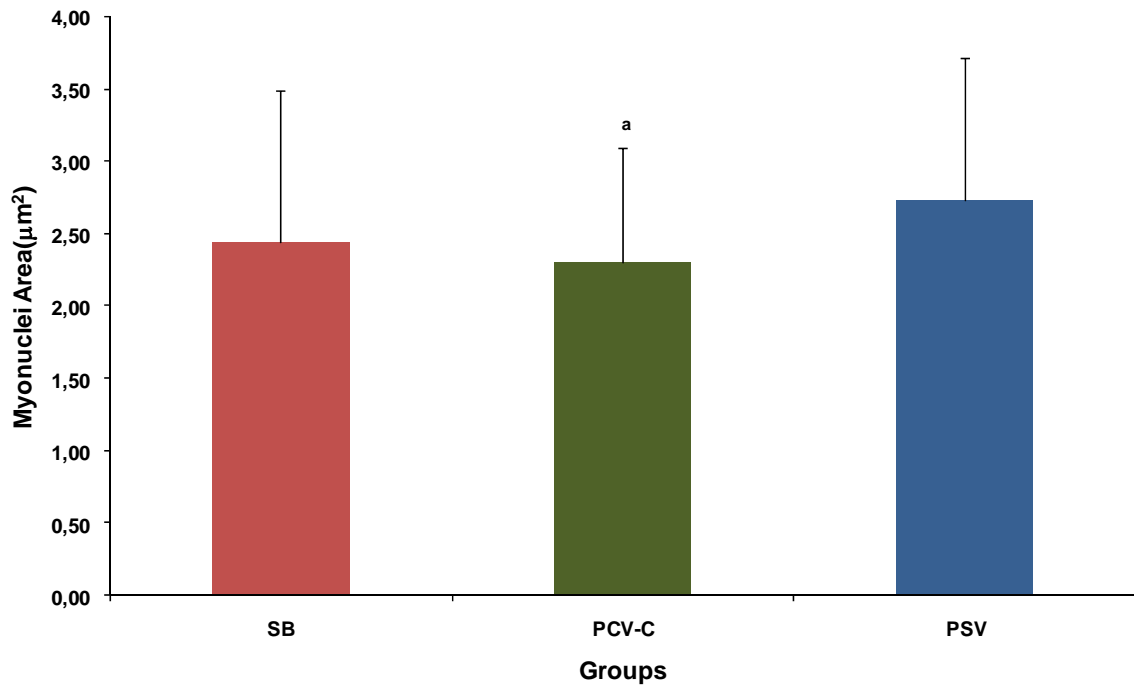


Figure 6 - Effects of controlled mechanical ventilation (PCV-C) and Pressure Support Ventilation (PSV) in myonuclei area of rat diaphragm muscle fibers. We observe muscle atrophy in PCV-C group compared to PSV group. Values are represented as mean \pm standard deviation. **a** ($p < 0.05$) (ANOVA, followed by Tukey test)

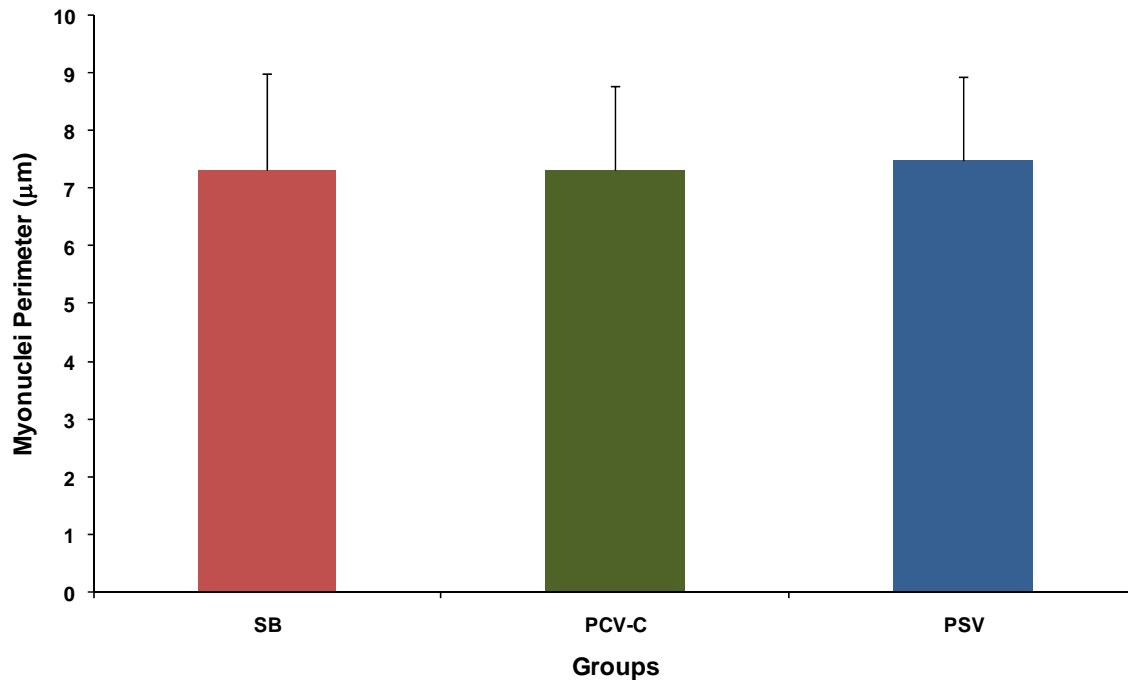


Figure 7 - Effects of controlled mechanical ventilation (PCV-C) and Pressure Support Ventilation (PSV) in myonuclei perimeter of rat diaphragm muscle fibers. No differences were observed between groups ($p > 0.05$). Values are represented as mean \pm standard deviation. (ANOVA, followed by Tukey test).

DISCUSSION

The major finding of this study, which is the second to compare the PSV mode with the CMV mode, is that, unlike the CMV, the PSV mode seems to attenuate diaphragmatic muscle disuse atrophy due to ventilatory support. This ventilator-induced diaphragmatic dysfunction (VIDD), analyzed in many studies, may be due to: muscle disuse atrophy, reduced protein synthesis, increased proteolytic activity, oxidative stress, intrinsic abnormalities (ultrastructural level) of muscle fibers, problems with the excitation-contraction coupling and myonuclear loss^{2,7,8,12,16,,23,24}.

Analysis of experimental design

Animal model was chosen to investigate the effects of mechanical ventilation (MV) because of the invasive nature of obtaining diaphragmatic biopsy in humans. Our considerations to choosing animal models involve pragmatic factors (animal size and cost) and the extrapolation of animal models to humans. In relation to pragmatic factors, rat is a relatively cheap model to study the effects of MV, and does not impose any technical difficulties during tracheostomy. Regarding the applicability in humans, rat is an excellent model to investigate diaphragm muscle, because both human and rat diaphragms are similar in anatomy, muscle fiber types and function^{25,26}.

To investigate the effects of MV on diaphragm, controlled mechanical ventilation (CMV) was chosen for two reasons. First, this mode has the advantage of producing rapid muscle atrophy¹². Second, although many patients receive assisted MV, i.e., with diaphragmatic participation, CMV has clinical relevance because this mode is used in adult patients on many circumstances (for ex: drugs overdose, spinal cord injuries, surgeries, etc). It is also well-recognized in some pediatric situations²⁷. Pressure support ventilation (PSV) was chosen because literature has only one study investigating the attenuation of protein catabolic effects by using this ventilation mode²⁸. This study analyzes diaphragmatic muscle atrophy and the PSV mode seems to preserve diaphragmatic muscle activity when compared with the CMV mode.

In this investigation, all groups received similar doses of anesthetics and sedatives during the experimental period. Animals did not receive anesthetic doses in a continuous form or neuromuscular blockers, like in other studies^{6,10}. Barbiturates and neuromuscular blockers have deleterious effects in skeletal muscle function²⁹. When applied on an intermittent manner, nevertheless, they do not contribute to VIDD²⁸.

During the experimental period of the PCV-C group, diaphragmatic electromyography was not used in our investigation, as seen in other studies about VIDD⁴. The objective of passive ventilation maybe could not be achieved, and it is possible that animal-ventilator asynchrony could have caused eccentric contractions, resulting in muscle lesion. The animals in our study, however, were monitored by flow and airway pressure waves. Alteration in airway pressure and flow waves suggest inspiratory efforts during MV, and have been show to coincide with electromyographic analysis³⁰. Uniform airway pressure and flow waves analyzed by the ventilator display, together with the consistence of the respiratory frequency set by the investigator, indicate that passive ventilation was in fact achieved. Occasionally, moments of diaphragmatic activity were observed, but were suppressed by adjusts in peak pressure, to increase tidal volume and consequently depress the respiratory center.

In the present study sodium bicarbonate was not administered to prevent metabolic acidosis. Metabolic acidosis can potentially influence diaphragmatic contractility^{31,32}. However, a study demonstrated no decrease in diaphragm strength when $\text{pH} > 6,8$ ³³. In this study, before each animal sacrifice, their arterial blood gas was analyzed, and all animals showed $\text{Ph} > 7,1$.

Muscle Atrophy

During MV, the diaphragm is intermittently and repetitively shortened by cyclical lung inflation³⁴. Therefore, changes in the respiratory rate and tidal volume applied during mechanical ventilation will necessarily alter the speed and extent of diaphragmatic shortening. The use of PEEP, on the other hand, will lead to baseline diaphragm shortening at functional residual capacity. It has long been known that the adverse effects of disuse on limb muscle structure are exacerbated by muscle shortening³⁵. In addition, maintaining skeletal muscles (including the diaphragm) in a shortened position causes a loss of sarcomeres in series^{36,37}. Interestingly, two studies that employed PEEP found that CMV for 48 hours or more resulted

in significantly decreased diaphragm muscle optimal length, a finding that strongly suggests the occurrence of such sarcomere loss^{10,11}. We applied a PEEP of 5cmH₂O in our study because, in pilot study, rats experimented ventilator asynchrony and suffered acute lung edema when values below that were used. Differences in myosin isoform expression patterns and the degree of atrophy observed among certain studies (in our study as well) may also be at least partly related to the levels of diaphragmatic shortening imposed by the specific ventilator settings applied in these investigations, especially by PEEP.

Controlled mechanical ventilation induces diaphragm muscle atrophy^{10,11,12,13}. VIDD develops rapidly, as early as 12 h after the institution of CMV¹⁷, and is more pronounced in the diaphragm, which atrophies earlier than the peripheral skeletal muscles that are also inactive during CMV^{10,11,12}. CMV, in our study, resulted in diaphragm muscle atrophy in only 6 hours of MV, which is a period shorter than seen on other studies.

Although reductions in force-generating capacity found after CMV can not be attributed only to muscle atrophy, diaphragmatic loss alters maximum force generation *in vivo*. In addition, the susceptibility of diaphragmatic fatigue *in vivo* is inversely proportional to maximum force³⁸, indicating that diaphragmatic atrophy will increase the risk of diaphragmatic fatigue once spontaneous breathing is assumed again (for instance, with two mechanical ventilation weaning trials³⁹). Reduction in diaphragm muscle mass and/or atrophy of muscle fibers after CMV were observed in our study. In general, disuse atrophy can be a result of decreased protein synthesis⁴⁰, increased proteolysis⁴¹, or both. Only in 6 hours of CMV, rats underwent an *in vivo* reduction in the protein synthesis rate of all muscle proteins by 30% and in the myosin heavy chain protein rate by 65%, both persisting during 18 hours of CMV⁴². In addition, 24 hours of CMV suppressed the levels of IGF-1 (insulin-growth factor) mRNA, which stimulates protein synthesis³. CMV, therefore, decreases protein synthesis in diaphragm muscle.

An increase in proteolysis in animals diaphragm submitted to 18 hours of CMV has already been studied¹². All mammalian cells proteases systems (lysosomal proteases, calpains, caspases and proteasome system⁴³) are activated after the onset of CMV^{7,12,44}, which is one more cause of the muscle fibers atrophy in PCV-C group observed in our study.

The decrease in area and minor diameter of muscle fibers observed in this study in the PCV-C group were not accompanied by reduction in area and perimeter of myonuclei when compared with the control group (SB). Skeletal muscle cells are multinucleated and, theoretically, a single myonucleus can supply the necessary gene expression for a determined area of cytoplasm, a relationship called myonuclear domain¹⁷. Literature demonstrates a

decreased volume of the cytoplasm (atrophy), which is accompanied by a decreased number of myonuclei, not analyzed in our study, but resulting in constant myonuclear domain⁷. That decrease in myonuclear content is mediated by an increase in caspase-3-dependent apoptosis, which was evident after only 6 hours of CMV⁷. Both apoptosis and atrophy were attenuated with caspase-3 inhibition. It is yet uncertain if assisted modes of mechanical ventilation, like the PSV mode, used in our study, could attenuate these deleterious effects of ventilatory support (muscle fiber atrophy and decreased myonuclei number).

Our study demonstrated that the PSV mode attenuated muscle fiber atrophy of diaphragm in rats. Moreover, in contrast with the PCV-C group, the PSV mode did not show a decrease in area and perimeter of myonuclei when compared to control (SB). Interestingly, the PSV group demonstrated an increase in area and perimeter of myonuclei when compared to the SB group, although this difference was not significant. Also, significant difference was observed in myonuclear area in the PCV-C group when compared with the PSV group. These differences in muscle fiber atrophy can be due to differences in the type of muscle lesion caused by the CMV and the PSV modes. In fact, like peripheral skeletal muscle models, during PSV, diaphragm undergoes a type of exercise in which there is an increase in respiratory activity (in comparison to the CMV)⁴⁵⁻⁴⁷. This exercise could protect diaphragm from modifications related to muscular inactivity caused by CMV. During CMV, there is a complete absence of neural activation and diaphragm mechanical activity^{2,4}, and a passive shortening of this muscle during lungs inflation^{34,36}. This trauma has been implicated in the origin of VIDD^{12,42}, particularly during sarcomere injury^{36,37} and during decreased force-generating capacity of diaphragm^{8,11}.

In summary, we demonstrated that PSV, in a few hours (six), seems to be capable of attenuating the deleterious effects observed when controlled mechanical ventilation is used, related to muscle fiber atrophy. We collected left diaphragm for further biochemical studies to correlate with the findings of this study and maybe suggest, with better scientific support, that the PSV mode can be an alternative way of limiting muscle atrophy and diaphragmatic dysfunction.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Antonio Roberto, chief of Experimental Surgery Department of Federal University of Pernambuco (UFPE) and his employees, for their assistance and Edeones França, for his technical and scientific support. This work was supported by CNPq and PROPESQ / UFPE

CONFLICTING INTERESTS

The authors declare that they have no conflicting interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Eduardo França and Indianara Araújo participated in the design of the study, carried out the study, and helped drafting the manuscript. They equally contributed to this work. André Oliveira participated in the design of the study, performed morphometrical analysis, and helped drafting the manuscript. Paloma Medeiros, Diógenes Mota, José Candido de Araújo Filho and Lívia Bandeira participated in the design of the study and helped drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Levine S, Nguyen T, Taylor N, Friscia ME, Budak MT, Rothenberg P, Zhu J, Sachdeva R, Sonnad S, Kaiser LR, Rubinstein NA, Powers SK, Shrager JB: Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med* 2008, 358:1327-1335
2. Powers SK, Shanely RA, Coombes JS, Koesterer TJ, McKenzie M, Van Gammeren D, Cicale M, Dodd SL. Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm. *J Appl Physiol* 2002;92:1851–1858.

3. 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;29:825–833.
4. Sassoon CSH, Caiozzo VJ, Manka A, Sieck GC. Altered diaphragm contractile properties with controlled mechanical ventilation. *J Appl Physiol* 2002;92:2585–2595.
5. Radell PJ, Remahl S, Nichols DG, Eriksson LI. Effects of prolonged mechanical ventilation and inactivity on piglet diaphragm function. *Intensive Care Med* 2002;28:358–364.
6. Anzueto A, Peters JI, Tobin MJ, De Los Santos R, Seidenfeld JJ, Moore G, Cox WJ, Coalson JJ. Effects of prolonged controlled mechanical ventilation on diaphragmatic function in healthy adult baboons. *Crit Care Med* 1997;25:1187–1190.
7. McClung JM, Kavazis AN, Deruisseau KC, Falk DJ, Deering MA, Lee Y, Sugiura T, Powers SK. Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation induced atrophy. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:150–159
8. Vassilakopoulos T, Petrof BJ: Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 169:336-341.
9. Lemaire F: Difficult weaning. *Intensive Care Med* 1993, 19(Suppl 2):S69-73.
10. Le Bourdelles G, Viïres 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;149:1539–1544.
11. Yang L, Luo J, Boudon J, Lin M, Gottfried SB, Petrof BJ. Controlled mechanical ventilation leads to remodeling of the rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1135–1140.
12. Shanely RA, Zergeroglu MA, Lennon SL, Sugiura T, Yimlamai T, Enns D, Belcastro A, Powers SK. Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1369–1374.
13. Capdevila X, Lopez S, Bernard N, Rabischong E, Ramonatxo M, Martinazzo G, Prefaut C. Effects of controlled mechanical ventilation on respiratory muscle contractile properties in rabbits. *Intensive Care Med* 2003;29:103–110.
14. Zergeroglu MA, McKenzie MJ, Shanely RA, VanGammeren D, DeRuisseau KC, and Powers SKI. Mechanical ventilation-induced oxidative stress in the diaphragm. *J Appl Physiol* 2003;95:1116–1124.
15. Racz GZ, Gayan-Ramirez G, Testelmans D, Cadot P, De Paepe K, Zador E, Wuytack F, Decramer M. Early changes in rat diaphragm biology with mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:297–304.

16. Sassoon CSH, Zhu E, Caiozzo VJ. Assist-control mechanical ventilation attenuates ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:626–632.
17. Allen DL, Roy RR, and Edgerton VR. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 1999; 22: 1350–1360.
18. Ayas NT, McCool FD, Gore R, Lieberman SL, Brown R. Prevention of human diaphragm atrophy with short periods of electrical stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:2018–2020
19. Betters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, Deering M, Yimlamai T, Powers SK. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:1179–1184
20. Jolliet P, Tassaux D: Clinical review: patient-ventilator interaction in chronic obstructive pulmonary disease. *Crit Care* 2006, 10:236.
21. Brander L, Slutsky AS: Assisted spontaneous breathing during early acute lung injury. *Crit Care* 2006, 10:102.
22. Conti G, Arcangeli A, Antonelli M, Cavaliere F, Costa R, Simeoni F, Proietti R: Sedation with sufentanil in patients receiving pressure support ventilation has no effects on respiration: a pilot study. *Can J Anaesth* 2004, 51:494-499
23. Jonghe B et al. Respiratory weakness is associated with limb weakness and delayed weaning in critical illness. *Crit Care Med* 2007; Vol. 35. N. 9.p. 2007-2015.
24. Nilsestuen JO; Hargett KD Using Ventilator Graphics to Identify Patient Ventilator Asynchrony. *Respiratory Care* 2005; vol. 50. n. 2. p. 202-234.
25. Mizuno M. Human respiratory muscles: fibre morphology and capillary supply. *Eur Respir J* 1991; 4:587–601
26. Powers SK, Demirel HA, Coombes JS, et al. Myosin phenotype and bioenergetic characteristics of rat respiratory muscles. *Med Sci Sports Exerc* 1997; 29:1573–1579
27. Hess D, Kacmarek RM. *Essentials of mechanical ventilation*. New York, NY: McGraw-Hill, Health Professions Division, 1996
28. Futier E, Constantin JE, Combaret L, Mosoni L, Roszyk L, Sapin V, Attaix D, Jung B, Jaber S, Bazin JE. Pressure support ventilation attenuates ventilator-induced protein modifications in the diaphragm. *Critical Care* 2008, 12:R116.
- 29 Giostra E, Magistris M, Pizzolato G, Cox J, and Chevrolet J. Neuromuscular disorder in intensive care unit patients treated with pancuronium bromide: occurrence in a cluster group

of seven patients and two sporadic cases, with electrophysiologic and histologic examination. *Chest* 1994; 106: 210–220.

30. Fernandez R, Mendez M, and Younes M. Effect of ventilator flow rate on respiratory timing in normal humans. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 710–719.

31. Fitzgerald RS, Hauer MC, Bierkamper GG, and Raff H. Responses in in vitro rat diaphragm to changes in acid-base environment. *J Appl Physiol* 1984; 57: 1202–1210.

32. Howell S, Fitzgerald RS, and Roussos C. Effects of uncompensated and compensated metabolic acidosis on canine diaphragm. *J Appl Physiol* 1985; 59: 1376–1382.

33. Coast JR, Shanley RA, Lawler JM, and Herb RA. Lactic acidosis and diaphragmatic function in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1648–1652.

34. Newman S, Road J, Bellemare F, Clozel JP, Lavigne CM, Grassino A. Respiratory muscle length measured by sonomicrometry. *J Appl Physiol* 1984;56:753–764.

35. Goldspink DF, Morton AJ, Loughna P, Goldspink G. The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscles of the rat. *Pflugers Arch* 1986;407:333–340.7

36. Williams PE, Goldspink G. The effect of denervation and dystrophy on the adaptation of sarcomere number to the functional length of the muscle in young and adult mice. *J Anat* 1976;122:455–465.

37. Farkas GA, Roussos C. Diaphragm in emphysematous hamsters: sarcomere adaptability. *J Appl Physiol* 1983;54:1635–1640.

38. Bellemare F, Grassino A. Force reserve of the diaphragm in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Appl Physiol* 1983;55:8–15.

39. Vassilakopoulos T, Zakyntinos 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;158:378–385.

40. KU Z et al. Decreased polysomal HSP-70 may slow polypeptide elongation during skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol* 1995; Vol. 268. p.1369-1374.

41. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704–1708.

42. Shanely RA, Van Gammeren D, Deruisseau KC, Zergeroglu AM, McKenzie MJ, Yarasheski KE, Powers SK. Mechanical ventilation depresses protein synthesis in the rat diaphragm. *Am J Respir Critical Care Med* 2004;170:994–999.

43. Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R337–R344.
44. Maes K, Testelmans D, Powers S, Decramer M, Gayan-Ramirez G. Leupeptin inhibits ventilator-induced diaphragm dysfunction in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:1134–1138
45. Ji LL, Stratman FW, Lardy HA: Enzymatic down regulation with exercise in rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 1988, 263:137-149.
46. Wakshlag JJ, Kallfelz FA, Barr SC, Ordway G, Haley NJ, Flaherty CE, Kelley RL, Altom EK, Lepine AJ, Davenport GM: Effects of exercise on canine skeletal muscle proteolysis: an investigation of the ubiquitin-proteasome pathway and other metabolic markers. *Vet Ther* 2002, 3:215-225
47. Stupka N, Tarnopolsky MA, Yardley NJ, Phillips SM: Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. *J Appl Physiol* 2001, 91:1669-1678.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A assistência ventilatória mecânica controlada leva a atrofia das fibras musculares diafragmáticas de ratos submetidos à AVM e o modo ventilatório Pressão de Suporte (PSV) parece atenuar o processo de atrofia das fibras musculares diafragmáticas de ratos submetidos ao suporte ventilatório. Esses achados ocorreram em um período curto de ventilação mecânica, apenas 6 horas. Coletamos o hemidiafragma esquerdo para estudos bioquímicos, para que futuramente, possamos correlacionar os novos achados com os que encontramos neste estudo, a fim de sugerir que a ventilação por Pressão de Suporte seria um meio alternativo para limitar a atrofia muscular diafragmática devido ao uso da ventilação mecânica.

REFERÊNCIAS

1. ALLEN DL, LINDERMAN JK, ROY RR, BIGBEE AJ, GRINDELAND RE, MUKKU V, EDGERTON VR. Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol*, v. 273:C579–C587, 1997.
2. ANZUETO A, PETERS JI, TOBIN MJ, DE LOS SANTOS R, SEIDENFELD JJ, MOORE G, COX WJ, COALSON JJ. Effects of prolonged controlled mechanical ventilation on diaphragmatic function in healthy adult baboons. *Crit Care Med*, v. 7; 25:1187–1190, 1997.
3. AZEREDO, C.A.C. Fisioterapia respiratória moderna. São Paulo: Manole, 2002.
4. AZEREDO, C.A.C. et al. Estudo prospectivo desenvolvido no Centro de Disfunção Diafragmática. Centro de Saúde e Pesquisa da Universidade Veiga de Almeida (CDD). Rio de Janeiro, 2003.
5. ARMANDO, A.A.J. et al. Association between ventilation index and time on mechanical ventilation in infants with acute viral bronchiolitis. *Jornal de Pediatria*. n. 6. v. 81. 2005.
6. BAKER AB: Artificial respiration: the history of an idea. *Med Hist*, v. 15:336–351, 1971.
7. BENSENOR, F.E.M.; CICARELLI, D.D. Sedação e Analgesia em terapia intensiva. *Rev. Brás. Anestesiologi*, v. 53:5. p.680-693, 2003.
8. BENSENOR, F.E.M. et al. Sedação Pós- operatória na Unidade de Apoio Cirúrgico do Hospital das Clínicas de São Paulo: Estudo Retrospectivo. *Rev. Brás. Anestesiologi*, v. 54:3. p.391-398, 2004.
9. BERNARD N, MATECKI S, PY G, LOPEZ S, MERCIER J, CAPDEVILA X. Effects of prolonged mechanical ventilation on respiratory muscle ultrastructure and mitochondrial respiration in rabbits. *Intensive Care Med*, 29: 111–118, 2003.

10. BRANSON RD, CHATBURN RL. Technical description and classification of modes of ventilator operation. *Respir Care*, v. 37:1026-44, 1992.
11. CHANG, A.T. et al. Reduced Inspiratory Muscle Endurance Following Successful Weaning From Prolonged Mechanical Ventilation. *Chest*, v.128. p. 553-559, 2005.
12. CHATBURN RL. Fundamentals of Mechanical Ventilation. Cleveland Heights, Ohio: Mandu Press Ltda, 2003.
13. CHIANG, L.L. et al. Effects of Physical Training on Functional Status in Patients With Prolonged Mechanical Ventilation. *Physical Therapy*, v. 86 . N. 9 . p.1271-1281, 2006.
14. DAVID, CM. Ventilação Mecânica. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
15. DIFFEE GM, CAIOZZO VJ, HERRICK RE, BALDWIN KM. Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension. *Am J Physiol*, v. 260:C528–C534, 1991.
16. DOURADO, V.Z.; GODOY, I. Recondicionamento muscular na DPOC: principais intervenções e novas tendências. *Rev Brás Méd Esporte*, v. 10. n.4, 2004.
17. DUPONT-VERSTEEGDEN EE, STROTMAN BA, GURLEY CM, GADDY D, KNOX M, FLUCKEY JD, PETERSON CA. Nuclear translocation of EndoG at the initiation of disuse muscle atrophy and apoptosis is specific to myonuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* v. 291:R1730– R1740, 2006.
18. ESTEBAN A, ALIA I, IBANEZ J, BENITO S, AND TOBIN MJ. Modes of mechanical ventilation and weaning. A national survey of Spanish hospitals. The Spanish Lung Failure Collaborative Group. *Chest* 106: 1188–1193, 1994.
19. FERRER, M. et al. Noninvasive ventilation after intubation and mechanical ventilation. *European Respiratory Journal*. n. 19. p. 959-965, 2002.

20. FUTIER E, CONSTANTIN JE, COMBARET L, MOSONI L, ROSZYK L, SAPIN V, ATTAIX D, JUNG B, JABER S, BAZIN JE. Pressure support ventilation attenuates ventilator-induced protein modifications in the diaphragm. *Critical Care*, 12:R116. 2008.
21. GALEN C: On the Functions of Parts of the Human Body. Darenberg C, translator. Paris: JB Balliere, 1954.
22. 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*, 29:825–833, 2003.
23. HOWMAN SF. Mechanical Ventilation: a review and update for clinicians. *Hospital Physician*. p. 26-36, 1999.
24. HIKIDA RS, VAN NOSTRAN S, MURRAY JD, STARON RS, GORDON SE, KRAEMER WJ. Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fibers. *Anat Rec*, 247:350–354, 1997
25. HOWELL S, FITZGERALD RS, AND ROUSSOS C. Effects of uncompensated and compensated metabolic acidosis on canine diaphragm. *J Appl Physiol* 59: 1376–1382, 1985.
26. JONGHE, B. et al. Respiratory weakness is associated with limb weakness and delayed weaning in critical illness. *Crit. Care Med*, v. 35. N. 9.p. 2007-2015, 2007.
27. JUNIOR, G.R.R.; AMARAL, J.L.G. Experiência clínica com o uso de sedativos em terapia intensiva. Estudo retrospectivo. *Rev Bras de Anesthesiol*. v..52. n.6, Nov/ Dec, 2002.
28. KU, Z. et al. Decreased polysomal HSP-70 may slow polypeptide elongation during skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol*. v. 268. p.1369-1374, 1995.

29. LEMAIRE F. Difficult weaning. *Intensive Care Med* 19, Suppl 2: S69–S73, 1993.
30. LEVINE S, NGUYEN T, TAYLOR N, FRISCIA ME, BUDAK MT, ROTHENBERG P, ZHU J, SACHDEVA R, SONNAD S, KAISER LR, RUBINSTEIN NA, POWERS SK, SHRAGER JB. Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med*, 358:1327-1335, 2008
31. LORETTA, Y.C.Y. et al. Non-invasive versus invasive mechanical ventilation for respiratory failure in severe acute respiratory syndrome. *Chinese Medical Journal*, v. 118. n. 17. p. 1413-1421, 2005.
32. MADOR, M.J, et al. Effect of Respiratory Muscle Endurance Training in Patients With COPD Undergoing Pulmonary Rehabilitation. *Chest*, v. 128. p.1218-1224, 2005.
33. MADOR, M.J, et al. Endurance and Strength Training in Patients With COPD. *Chest* 125 (6) 2036-2045, 2004.
34. MARTIN, U.J.M.D. et al. Impact of whole-body rehabilitation in patients receiving chronic mechanical ventilation. *Crit Care Med*, v. 33. N. 10. p. 2259-2265, 2005.
35. NILSESTUEN, J.O; HARGETT, K.D. Using Ventilator Graphics to Identify Patient Venti-lator Asynchrony. *Respiratory Care*, v. 50. n. 2. p. 202-234, 2005.
36. PINHEIRO BV, HOLANDA MA, LARGES CM, BEPPU OS. Ventilação mecânica volume-controlada versus pressão controlada em modelo canino de lesão pulmonar aguda: efeitos cardiorrespiratórios e sobre o custo de oxigênio da respiração. *J Pneumol*, ;28(1):15-22, 2008.
37. POWERS, S.; SHANELY, R.A.; COOMBES, J.; KOESTERER, T.; MCKENZIE, M.; VAN GAMMEREN, D.; CICALÉ, M.; AND DODD, S. Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm. *J Appl Physiol*. 92: 1851–1858, 2002.

38. POWERS SK, SHANELY RA. Exercise-induced changes in diaphragmatic bioenergetic and antioxidant capacity. *Exerc Sport Sci Rev*, 30:69-74, 2002.
39. POWERS SK, KAVAZIS AN, DERUISSEAU KC. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* , 288:R337–R344, 2005.
40. PRIMEAU AJ, ADHIHETTY PJ, HOOD DA. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol*, 27:349–395, 2002
41. SANDRI M. Apoptotic signaling in skeletal muscle fibers during atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 5:249–253, 2002.
42. SASSOON, C.S.H.; CAIOZZO, V.J.; MANKA, A.; SIECK, G.C. GC. Altered diaphragm contractile properties with controlled mechanical ventilation. *J Appl Physiol*, 92:2585–2595, 2002
43. SASSOON, C.S.H.; ZHU, E.; CAIOZZO, V.J. Assist-control mechanical ventilation attenuates ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*, 170:626–632, 2004
44. SHANELY, R.A. et al. Mechanical Ventilation–induced Diaphragmatic Atrophy Is Associated with Oxidative Injury and Increased Proteolytic Activity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 166. p.1369-1374, 2002.
45. SHANELY, R.; COOMBES, J.; ZERGEROGLU, A.M.; WEBB, A.; AND POWERS, S. Short-duration mechanical ventilation enhances diaphragmatic fatigue resistance but impairs maximal force production. *Chest*, 123: 195–201, 2003
46. SHANELY RA, VAN GAMMEREN D, DERUISSEAU KC, ZERGEROGLU AM, MCKENZIE MJ, YARASHESKI KE, POWERS SK. Mechanical ventilation depresses protein synthesis in the rat diaphragm. *Am J Respir Critical Care Medicine*, 170:994–999, 2004

47. SIMONE, D.O.S. et al. Peripheral Muscle Strength Training in COPD. *Chest*, v. 126. n. 3, 2004.
48. SLULLITEL, A; SOUSA, A.M. Analgesia, sedação e bloqueio neuromuscular em UTI. *Rev. Medicina de Ribeirão Preto: Simpósio: Medicina intensiva - 4ª parte, capítulo II. Vol.31.* p. 507-516, 1998.
49. TSIKA RW, HERRICK RE, BALDWIN KM. Time course adaptations in rat skeletal muscle isomyosins during compensatory growth and regression. *J Appl Physiol*, 63:2111–2121, 1987.
50. VASSILAKOPOULOS, T.; PETROF, B.J. BJ. Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*;169:336–341, 2004
51. VOJVODIC, C. Síndrome do Imobilismo. Trabalho de conclusão de curso-Especialização de Fisioterapia Respiratória em Ventilação mecânica com ênfase em Traumatologia cirúrgica. TG1 – Turma Glória 1. 2004. 7f.
52. YANG L, LUO J, BOURDON J, LIN MC, GOTTFRIED SB, PETROF BJ. Controlled mechanical ventilation leads to remodeling of the rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med*;166:1135–1140, 2002.
53. ZERGEROGLU, MA. Mechanical ventilation-induced oxidative stress in the diaphragm. *J Appl Physiol*, v. 95. p.1116 - 1124, 2003.
54. ZHAN, WZ.; FARKAS, GA.; SCHROEDER, MA.; GOSSELINK, LE.; SIECK, GC Regional adaptations of rabbit diaphragm muscle fibers to unilateral denervation. *J Appl Physiol*, 79: 941–950, 1995.

ANEXOS

ANEXO I - Normas da revista *Respiratory Medicine*

Respiratory Medicine is an internationally-renowned, clinically-oriented journal, combining cutting-edge original research with state-of-the-art reviews dealing with all aspects of respiratory diseases and therapeutic interventions, but with a clear clinical relevance. The journal is an established forum for the publication of phased clinical trial work at the forefront of interventional research. As well as full-length original research papers, the journal publishes reviews, correspondence, and short reports. The Journal also publishes regular supplements on areas of special interest.

Online Submission of Manuscripts

<http://ees.elsevier.com/yrmed>

Submission and peer review of all papers is now conducted entirely online, increasing efficiency for editors, authors, and reviewers, and enhancing publication speed. Authors are guided stepwise through the entire process, and are kept abreast of the progress of their paper at each stage.

The system creates PDF version of the submitted manuscript for peer review, revision and proofing. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, is conducted by e-mail.

Authors requesting further information on online submission are strongly encouraged to view the system, including a tutorial, at <http://ees.elsevier.com/yrmed>

Authors are asked to bear in mind the guideline peer review and publication times available at the *Respiratory Medicine* journal homepage: click here for [Journal News](#).

Peer Review

Submissions are allocated to a handling editor, typically an Associate Editor. Should the paper be considered suitable for peer review, appropriate reviewers will be recruited. Authors are required to provide the name and full contact details of 2 potential reviewers, though choice of reviewers is at the discretion of the handling editor.

The final decision-making responsibility lies with the handling editor, who reserves the right to reject the paper despite favourable reviews depending on the priorities of the journal.

For full details on the peer review process and current peer review decision times please click here for [Journal News](#).

Cover letter

Corresponding authors must provide a cover letter which includes statements answering the following questions:

- Has the work been seen and approved by all co-authors?
- How is the work clinically relevant, and how does it add to existing research?
- Have papers closely related to the submitted manuscript been published or submitted for publication elsewhere? If so please provide details.

Failure to provide a cover letter addressing each of the questions above will result in the paper being returned to the author. The cover letter must be uploaded as a separate submission item. For queries, please contact the journal editorial office directly: respiratorymedicine@elsevier.com

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

The potential for conflict of interest exists when an author (or the author's institution), reviewer or editor has financial or personal relationships that may inappropriately influence his or her actions. Editors and reviewers for the journal are responsible for disclosing to the Chief Editor any personal or financial relationship that may bias their work during the peer review process.

Authors are specifically asked to reflect on financial conflicts of interest (such as employment, consultancy, stock ownership, honoraria and paid expert testimony) as well as other forms of conflict of interest, including personal, academic and intellectual issues. For the conflict of interest statement all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. The Conflict of Interest Statement is a mandatory submission item: authors are required to submit the statement to proceed with their submission. Conflict of Interest statements will typically be published within the body of the article, and will appear preceding the references section. All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Randomised controlled trials

All randomised controlled trials submitted for publication in Respiratory Medicine should include a completed Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org> for more information. Respiratory Medicine has adopted the proposal from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) which require, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. For this purpose, a clinical trial is defined as

any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration. Further information can be found at <http://www.icmje.org>

Disclosure of Clinical Trial Results

When submitting a Clinical Trial paper to the journal via the online submission system please select *Clinical Trial Paper* as an article type.

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (eg, investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

Supplementary material

Respiratory Medicine accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article including ScienceDirect:

<http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Ethics

Work on human beings that is submitted to *Respiratory Medicine* should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Copyright

Accepted papers become the copyright of the Journal and are accepted on the understanding that they have not been published, are not being considered for publication elsewhere and are subject to editorial revision. If papers closely related to the submitted manuscript have been

published or submitted for publication elsewhere, the author must state this in their cover letter. Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a "Journal Publishing Agreement" (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/authors>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form.

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>. Or email healthpermissions@elsevier.com.

Manuscript submission checklist

Authors should ensure they have uploaded the following as separate items in order for the editorial office to process their submission. Failure to provide any of the mandatory items below will result in the manuscript being returned to the author.

- Cover letter (mandatory)
- Abstract (including clinical trial registration number where appropriate) (mandatory)
- Conflict of Interest Statement (mandatory) Manuscript including ethics statement as appropriate (mandatory)
- Artwork (optional)
- Supplementary files eg. datasets, video files (optional)
- Permissions letters (As necessary, see below)
- Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart as appropriate

Reviews

The journal welcomes submission of state-of-the-art reviews on important topics with a clinical relevance. Potential review authors are encouraged to contact the Deputy Editor Dr N. Hanania hanania@bcm.tmc.edu in advance with their review proposals.

Case Reports (Respiratory Medicine CME)

All case reports will henceforth no longer be considered for publication in Respiratory Medicine, but instead for the sister publication **Respiratory Medicine CME**. *Please note that this is a separate publication to the regular journal. Case reports may be submitted for consideration for Respiratory Medicine CME via the same online submission site as the regular journal, as described below. Authors are urged to visit [Respiratory Medicine CME](#) for specific information and acceptance criteria used.*

Preparing your manuscript

Authors are asked to bear in mind the following additional points before entering the submission process.

Format and Structure

Most text formats can be accommodated, but Microsoft Word is preferable. In general, articles should conform to the conventional structure of Summary, Introduction, Methods, Results, Discussion and References.

Title

Your title page, should give the title in capital letters (not exceeding 100 letters), a running title (not exceeding 50 letters) and the authors' names (as they are to appear), affiliations and complete addresses, including postal (zip) codes. The author and address to whom correspondence should be sent must be clearly indicated. Please supply telephone, fax and e-mail numbers for the corresponding author.

Abstract

An abstract of your manuscript summarizing the content, at a maximum of 250 words, should be provided as a separate submission item.

Reference Format

Manuscripts should use the 'Embellished Vancouver' style for references, as follows:

Text: Indicate references by superscript numbers in the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

1. Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000; **163**:51-9.

Reference to a book:

2. Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc; 1999, p. 281-304. Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-34), see also http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html

Figures

Figures of good quality should be submitted online as a separate file. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, consult: <http://www.elsevier.com/authors>. Permission to reproduce illustrations should always be obtained before submission and details included with the captions.

Tables

Tables should be submitted online as a separate file, bear a short descriptive title, and be numbered in Arabic numbers. Tables should be cited in the text.

Keywords

A list of three to six keywords should be supplied: full instructions are provided when submitting the article online.

Units and Abbreviations

These should be given in SI units with the traditional equivalent in parentheses where appropriate. Conventions for abbreviations should be those detailed in *Units, Symbols, and Abbreviations*, available from the Royal Society of Medicine.

Language Editing

Papers will only be accepted when they are written in an acceptable standard of English. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

Brief Communications

These should be submitted as detailed above but should not exceed 1000 words, and may normally contain only one illustration or table. Brief communications containing new information may be selected for rapid peer review and publication at the discretion of the editor and editorial board.

Permissions Information

If illustrations are borrowed from published sources, written permission must be obtained from both publisher and author, and a credit line giving the source added to the legend. If text material totalling 250 to 300 words, or any tables, are borrowed verbatim from published sources, written permission is required from both publisher and author. With shorter quotations, it is sufficient to add a bibliographic credit. Permission letters for reproduced text or illustration must accompany the manuscript. If you have been unable to obtain permission, please point this out.

Fast-track Publication

The journal aims for prompt publication of all accepted papers. Submissions containing new and particularly important data may be fast-tracked for peer review and publication; this is a limited facility and is strictly at the discretion of the Chief Editor.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author which they are requested to correct and return within 48 hours. Only minor corrections are acceptable at this stage. If we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from [Adobe](#). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the [Adobe](#) site. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness the text, tables and figures.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Accepted Articles

For the facility to track accepted articles and set email alerts to inform you of when an article's status has changed Visit:<http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html> There are also detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Editorial office

To contact the Respiratory Medicine editorial office, please email respiratorymedicine@elsevier.com. We aim to respond to all queries rapidly.

ANEXO II – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 21 de outubro de 2008

Ofício nº 71/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profª. Paloma Lys de Medeiros**
Departamento de Histologia e Embriologia – CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 012736 / 2008 - 16

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **“Efeitos da assistência ventilatória mecânica sobre o músculo diafragma de ratos”**.


Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Observação:
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição; Animais: Ratos; Wistar; Sexo: machos; Idade: 90 dias; Número de animais previsto no protocolo: 18 animais.

 Profª. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA