

JOSÉ HENRIQUE PIRES LEITE JÚNIOR

EFEITOS DO CORTICOSTERÓIDE NA LESÃO
PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR VIA DIRETA
E INDIRETA

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UFRJ

**EFEITOS DO CORTICOSTERÓIDE NA LESÃO PULMONAR
AGUDA INDUZIDA POR VIA DIRETA E INDIRETA**

JOSÉ HENRIQUE PIRES LEITE JÚNIOR

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências. Doutorado em Fisiologia no contexto do Programa de Formação em Pesquisa Médica.

ORIENTADORA: PATRICIA RIEKEN MACEDO ROCCO

RIO DE JANEIRO

ABRIL DE 2006

EFEITOS DO CORTICOSTERÓIDE NA LESÃO PULMONAR

AGUDA INDUZIDA POR VIA DIRETA E INDIRETA

JOSÉ HENRIQUE PIRES LEITE JÚNIOR

ORIENTADORA: PATRICIA RIEKEN MACEDO ROCCO

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

APROVADA POR:

Prof. José Roberto Lapa e Silva, Ph.D
Prof. Titular, HUCFF, UFRJ

Prof. Elnara Márcia Negri, Ph.D
Prof. Adjunta, Faculdade de Medicina, USP

Prof. Vânia Maria Correa da Costa, Ph.D
Prof. Adjunto, IBCCF°, UFRJ

Prof. Patricia Rieken Macedo Rocco, Ph.D - Orientadora
Prof. Adjunta, IBCCF°, UFRJ

Prof. Carmen Cabanelas Pazos de Moura, Ph.D - Revisora
Prof. Adjunta, IBCCF°, UFRJ

Prof. Doris Rosenthal, Ph.D – Suplente Interno
Prof. titular, IBCCF°, UFRJ

Prof. Hugo Castro Faria Neto, Ph.D – Suplente Externo
Pesquisador, FIOCRUZ

Rio de Janeiro
Abril de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Leite-Júnior, José Henrique Pires

EFEITOS DO CORTICOSTERÓIDE NA LESÃO PULMONAR AGUDA
INDUZIDA POR VIA DIRETA E INDIRETA / José Henrique Pires Leite
Júnior. - Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF^o, 2006

xx, 123f.: il.; 1,5 cm.

Orientador: Patricia Rieken Macedo Rocco

Tese (doutorado) – UFRJ/IBCCF^o/Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas (Fisiologia), 2006

Referências Bibliográficas: f. 92-123

1. Corticosteróide 2. Lesão Pulmonar Aguda 3. Inflamação 4.
Remodelamento 5. Histologia 6. Mecânica Respiratória I. Rocco, Patricia
Rieken Macedo II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de
Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas (Fisiologia). III. Título

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Investigação Pulmonar e Fisiologia da Respiração do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-MCT, PRONEX-FAPERJ).

A Deus,
meu amigo.

A Elisama,
meu amor e carinho, sempre.

Ao Luiz Felipe,
por você tudo vale a pena.

A Sueli, minha mãe,
sem você nada seria possível.

A Silvia, minha vó,
pelo encorajamento em todos os momentos.

Ao meu vô, Manuel,
através de quem tudo isso começou, saudades.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração desta tese e outras, que por sua presença, neste período da minha vida, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. A estas pessoas eu devo os meus agradecimentos:

- Prof^ª Patricia Rocco, mais do que uma orientadora, amiga. Agradeço pelo ensino, pela tolerância, e por ter me dado força até o presente momento.
- Prof^º Walter Zin, pelo exemplo de pesquisador. Agradeço a oportunidade concedida para elaboração da minha tese e outros trabalhos científicos.
- Prof^ª Patrícia Bozza, obrigado pelo empenho e pelas críticas, sempre muito construtivas.
- Andréia Larangeira, pela realização da dosagem de citocinas, muitas vezes em horários pouco convencionais.
- Prof^ª Vera Capellozi e Elnara Negri, pela realização da microscopia eletrônica e quantificação de fibras elásticas e colágenas.
- Ao Prof. Paulo Mourão, pelo incentivo ao colocar em prática o Programa MD/PhD, e incluir os alunos que já estavam trabalhando nos laboratórios.
- Alba Fernandes, a quem devo muito na realização deste trabalho.
- Cristiane Nascimento, pela ajuda nas horas certas.
- Aos demais alunos do laboratório, que de alguma forma estiveram presentes durante todos estes anos, eu deixo aqui o meu profundo agradecimento.
- Ao Sr. Antônio, técnico do Laboratório de Fisiologia da Respiração, que me ajudou sempre com tanta presteza quando precisei.
- A todas as pessoas da minha família, pelo carinho.
- Aos meus tios Date e Neide. Sem vocês as noites seriam mais frias.

RESUMO**EFEITOS DO CORTICOSTERÓIDE NA LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR VIA DIRETA E INDIRETA**

José Henrique Pires Leite Júnior

Orientadora: Patricia Rieken Macedo Rocco

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do corticosteróide em modelo de Lesão Pulmonar Aguda (LPA) direta e indireta. Camundongos BALB/c foram divididos randomicamente em 6 grupos. No grupo C, instilou-se intratraquealmente (CT) ou injetou-se intraperitonealmente (CP) salina. No grupo L, lipopolissacarídeo de *E. coli* foi instilado (10 µg i.t., LT) ou injetado (125 µg i.p., LP). Nos grupos MT e MP, injetou-se metilprednisolona (2 mg/kg i.v.) uma hora após a administração de LPS. Após 24 h, a mecânica respiratória *in vivo* (elastâncias estática e dinâmica, e pressões resistiva e viscoelástica) e *in vitro* (elastância e resistência teciduais e histeresividade), histologia (microscopia óptica e eletrônica) e conteúdo de fibras elásticas e colágenas no septo alveolar foram quantificados. Em grupos paralelos, IL-6, KC (IL-8), percentual de neutrófilos e TGF-β foram mensurados no fluido do lavado broncoalveolar 24 e 48 horas após a indução da LPA. Todos os parâmetros mecânicos *in vivo* e *in vitro*, morfométricos e o conteúdo de fibras colágenas aumentaram similarmente nos grupos L em relação aos respectivos controles. No entanto, IL-6, KC, neutrófilos e TGF-β se elevaram mais na LT do que na LP. O corticosteróide foi capaz de atenuar as alterações da mecânica *in vivo*, morfometria e dosagem de citocinas apenas no grupo LT. Entretanto, o esteróide inibiu as modificações da mecânica tecidual e do conteúdo de fibras colágenas em ambos os grupos LT e LP. Em conclusão, o corticosteróide inibiu o remodelamento da matriz extracelular independentemente da etiologia da lesão, mas atenuou a resposta inflamatória e as alterações da mecânica *in vivo* somente na LPA direta.

Palavras-chave: Lesão Pulmonar Aguda, Corticosteróide, Remodelamento.

Rio de Janeiro

Abril de 2006

ABSTRACT**EFFECTS OF CORTICOSTEROIDS IN DIRECT AND INDIRECT ACUTE LUNG INJURY**

José Henrique Pires Leite Júnior

Orientadora: Patricia Rieken Macedo Rocco

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

We studied the effects of corticosteroid in a model of direct and indirect acute lung injury (ALI). BALB/c mice were randomly divided into 6 groups. In C group, saline was intratracheally instilled (CT) or intraperitoneally injected (CP). In L group, *E. coli* lipopolysaccharide was instilled (10 µg i.t., LT) ou injected (125 µg i.p., LP). One hour after LPS administration, methylprednisolone (2 mg/kg i.v.) was injected. After 24 h, *in vivo* (static and dynamic elastances, resistive and viscoelastic pressures) and *in vitro* pulmonary mechanics (tissue elastance and resistance, and histeresivity), histology (light and eletron microscopy), and the amount of collagen and elastic fibers in the alveolar septa were quantified. In parallel groups, IL-6, KC (IL-8), neutrophils and TGF-β were measured in the bronchoalveolar lavage fluid at 24 and 48 h. All *in vivo* and *in vitro* mechanical and morphometric parameters, and collagen fiber content were higher in LT and LP groups compared to the respective control. However, IL-6, KC, neutrophils, and TGF-β were higher in LT than LP. Corticosteroid attenuated the *in vivo* mechanical and morphometric parameters, and cytokines levels only in LT group. However, corticosteroid was able to inhibit tissue mechanical parameters and collagen fibers content in both LT and LP groups. In conclusion, steroid therapy is effective to inhibit fibrogenesis independent of the etiology of lung injury, but its ability to attenuate inflammatory responses and *in vivo* mechanical changes varies according to the cause of ALI.

Keywords: Acute Lung Injury, Corticosteroids, Remodeling.

Rio de Janeiro

Abril de 2006

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| Ficha catalográfica..... | iv |
| Resumo..... | viii |
| Abstract..... | ix |
| Sumário..... | x |
| Índice de abreviaturas..... | viii |
| Índice de tabelas..... | xi |
| Índice de figuras..... | xiii |
| I. INTRODUÇÃO | 1 |
| I.1. Patogênese da LPA | 4 |
| I.2. LPA de origem direta e indireta | 13 |
| I.3. LPA por via direta e indireta são síndromes diferentes | 15 |
| I.4. O uso do corticosteróide na LPA | 20 |
| II. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE | 30 |
| III. OBJETIVOS | 33 |
| IV. MATERIAIS E MÉTODOS | 34 |
| IV.1. Grupos experimentais | 34 |
| IV.2. Mecânica respiratória <i>in vivo</i> | 36 |
| IV.3. Remoção dos pulmões | 42 |
| IV.4. Mecânica respiratória <i>in vitro</i> | 42 |
| IV.5. Análise histopatológica | 47 |
| IV.6. Microscopia eletrônica de transmissão | 50 |
| IV.7. Análise do lavado broncoalveolar | 51 |
| IV.8. Análise estatística | 53 |

| | |
|--|-----------|
| V. RESULTADOS | 54 |
| VI. DISCUSSÃO | 74 |
| | |
| VI.1. Alterações da mecânica pulmonar <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> | 75 |
| VI.2. Análise histológica | 78 |
| VI.3. Inflamação | 80 |
| VI.4. Remodelamento | 82 |
| VI.5. Possíveis mecanismos de ação do corticosteróide na LPA | 86 |
| VII. CONCLUSÃO | 91 |
| VIII. REFERÊNCIAS | 92 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Montagem experimental | 38 |
| Figura 2 – Método de oclusão ao final da inspiração | 41 |
| Figura 3 – Montagem experimental para medida da mecânica tecidual | 45 |
| Figura 4 – Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado na morfometria | 48 |
| Figura 5 – Elastâncias estática, dinâmica e variação de elastância | 55 |
| Figura 6 – Variação de pressões viscosa, viscoelástica e total | 56 |
| Figura 7 – Fotomicrografia de parênquima pulmonar corado com H&E | 59 |
| Figura 8 – Percentual de celularidade total e diferencial por unidade de septo no parênquima pulmonar | 60 |
| Figura 9 – Interleucina 6 | 63 |
| Figura 10 – KC | 64 |
| Figura 11 – TGF- β | 65 |
| Figura 12 – Fotomicrografia de parênquima pulmonar corado com <i>Sirius Red</i> . | 67 |
| Figura 13 – Fotomicrografia de parênquima pulmonar corado com o método de resorcina-fucsina de Weigert | 68 |
| Figura 14 – Fotomicrografias eletrônicas na lesão pulmonar aguda por via direta | 70 |
| Figura 15 - Fotomicrografias eletrônicas na lesão pulmonar aguda por via indireta | 71 |
| Figura 16 – Fotomicrografias eletrônicas de animais tratados com metilprednisolona 1 h após a indução da lesão | 72 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Fluxo, volume e tempo inspiratório | 54 |
| Tabela 2 – Elastância, resistência e histeresividade do parênquima pulmonar | 57 |
| Tabela 3 – Morfometria pulmonar | 58 |
| Tabela 4 – Celularidade total e diferencial no fluido do lavado broncoalveolar | 61 |
| Tabela 5 – Quantificação de fibras colágenas e elásticas no septo alveolar ... | 66 |
| Tabela 6 – Correlação entre parâmetros da mecânica pulmonar e o percentual de colapso alveolar | 73 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AP-1 - activation protein-1

BALF - Fluido do lavado bronquíolo alveolar

C - capilar

COL - fibras colágenas

DAD - Dano Alveolar Difuso

Edyn - elastância dinâmica do pulmão

EPM - erro padrão da média

Est - elastância estática do pulmão

FiO₂ - fração inspirada de oxigênio

FR - frequência respiratória

GR – Receptor de Glicocorticóide

I κ B - inibidor de NF- κ B

IL - interleucina

LPA - Lesão Pulmonar Aguda

m ϕ - macrófago alveolar

MEC - matriz extracelular

MODS - Síndrome de Disfunção Orgânica Múltipla

NF- κ B - fator nuclear- κ B

PaO₂ - Pressão parcial arterial de oxigênio

PEEP - pressão positiva ao final da expiração

Pel - pressão de retração elástica pulmonar

Pi - ponto de inflexão

PL - pressão transpulmonar

Pmax - pressão máxima

Ptr - pressão traqueal

R - resistência tecidual

Req - resistência do equipamento

RNAm - ácido ribonucléico mensageiro

SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

V' - fluxo inspiratório

V_T - volume corrente

VILI - lesão pulmonar induzida pelo ventilador

TC - tomografia computadorizada

TNF - fator de necrose tumoral

ΔE - variação de elastância dos pulmões

ΔP_{tot} - variação de pressão total dos pulmões

ΔP_1 - variação de pressão necessária para vencer o componente viscoso pulmonar

ΔP_2 - variação de pressão necessária para vencer o componente viscoelástico e/ou inhomogêneo dos pulmões

I. INTRODUÇÃO

Desde a sua descrição, a Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e sua forma mais grave, a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), são um importante problema nas Unidades de Terapia Intensiva devido a sua alta mortalidade. Estima-se que 17 a 26 por 100 mil habitantes por ano nos Estados Unidos apresentam LPA/SDRA (Moss et al., 2002). Apesar dos avanços na terapêutica da síndrome, sua mortalidade mantém-se elevada (40-60%) (Ware e Matthay, 2000) e os sobreviventes podem apresentar seqüelas graves pulmonares e não pulmonares (Herridge et al., 2003).

Em 1967, Ashbaugh e colaboradores descreveram uma entidade clínica caracterizada por falência respiratória aguda, cianose refratária a oxigenioterapia, diminuição da complacência pulmonar e evidência de infiltrados difusos na radiografia de tórax (Ashbaugh et al., 1967). Os autores a denominaram inicialmente “Síndrome do Desconforto Respiratório do Adulto” (Petty et al., 1971), a fim de se contrapor à “Síndrome da Membrana Hialina do Recém-Nascido”, causada pela falta de surfactante pulmonar. Os consensos atuais, por sua vez, recomendam o uso do termo “Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo” devido ao acometimento de adolescentes e crianças (Bernard et al., 1994; Artigas et al., 1998).

Murray e colaboradores ampliaram esta definição propondo um sistema de escore de pontos que quantificava a deterioração da fisiologia respiratória com base no nível da pressão positiva medida no final da expiração (PEEP), na relação PaO_2/FiO_2 , na complacência estática e no grau de infiltrado pulmonar

visto na radiografia de tórax (Murray et al., 1988). Outros fatores considerados eram a causa da síndrome e a presença ou não de disfunção orgânica extrapulmonar. O escore de Murray não foi capaz de prever a evolução durante as primeiras 24-72 horas após o início da LPA, tendo uso clínico limitado (Doyle et al., 1995; Zilberberg et al., 1998). Entretanto, quando usado entre 4 e 7 dias do início da síndrome, valores iguais ou maiores que 2,5 podem prever complicações, com necessidade de ventilação mecânica prolongada (Heffner et al., 1995).

O consenso Americano-Europeu (Bernard et al., 1994; Artigas et al., 1998) definiu a LPA / SDRA como um processo inflamatório associado ao aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, resultando na formação de edema pulmonar não decorrente da elevação da pressão hidrostática (pressão capilar pulmonar ≤ 18 mmHg ou ausência clínica de hipertensão atrial esquerda). Essas alterações resultam na diminuição da complacência estática do sistema respiratório e aumento do *shunt* pulmonar, caracterizado pela existência de regiões pulmonares perfundidas mas não ventiladas, o que explica a persistência da hipoxemia mesmo após a instituição da oxigenioterapia. Clinicamente, ocorre dispnéia de início súbito acompanhada de infiltrado difuso à radiografia de tórax e hipoxemia grave à gasometria arterial. Portanto, considera-se o comportamento evolutivo da síndrome como um *continuum* de anormalidades na troca gasosa, definindo-se LPA quando a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ for menor ou igual a 300, e SDRA quando menor ou igual a 200.

Os fatores de risco para LPA foram estudados por vários autores (Fowler et al., 1983; Montgomery et al., 1985), sendo separados pelo consenso

americano-europeu (Bernard et al., 1994; Artigas et al., 1998) em dois grupos, dependendo se a via inicial de lesão é direta, com comprometimento primário da integridade do epitélio das vias respiratórias; ou indireta, caso o endotélio vascular tenha sido o sítio inicial de lesão. Dentre as causas diretas, podemos citar: pneumonias, aspiração de conteúdo gástrico, contusão pulmonar, afogamento e inalação de gases tóxicos. Entre as causas indiretas, destacam-se sepse com ou sem hipotensão clinicamente significativa (pressão sistólica ≤ 90 mmHg), trauma não torácico grave, múltiplas transfusões, *bypass* cardiopulmonar e pancreatite aguda.

Em meados de 1970, a LPA tornou-se mais facilmente reconhecida devido à possibilidade da medida da pressão encunhada da artéria pulmonar (Swan et al., 1970), sendo possível excluir causas de edema pulmonar secundárias ao aumento da pressão hidrostática. Apesar de ter sido utilizado como parâmetro de inclusão em muitos estudos clínicos, atualmente a pressão encunhada da artéria pulmonar não é medida de forma rotineira (Bernard, 2005). Vários autores têm considerado que uma pressão da artéria pulmonar elevada não é essencial para excluir o diagnóstico de LPA, uma vez que uma permeabilidade da barreira alvéolo-capilar alterada pode coexistir com a sobrecarga de volume. Além disso, mesmo em condições em que a pressão da artéria pulmonar é ≤ 18 mmHg, não se pode afirmar que a origem do edema pulmonar seja exclusivamente secundária ao aumento da permeabilidade, uma vez que a redução da pressão oncótica também pode contribuir com a origem do edema pulmonar (Weil et al., 1978; Mangialardi et al., 2000).

Vários modelos experimentais têm examinado a resposta inflamatória na LPA iniciada por infecção, trauma, queimadura e hemorragia (Bone et al., 1997; Menezes et al., 2005). Estes estudos têm demonstrado a complexidade e multiplicidade das vias envolvidas neste processo, indicando que diferenças na lesão inicial associada a outras condições subjacentes podem resultar na ativação de diferentes mecanismos fisiopatológicos. Estes resultados levam a crer que, na dependência destes vários mecanismos, a síndrome deveria responder de forma diferenciada às medidas terapêuticas específicas, pelo menos durante sua fase aguda.

I.1. PATOGÊNESE DA LPA

As alterações patológicas pulmonares da LPA são denominadas, em conjunto, como *dano alveolar difuso* (DAD). A fase exudativa é caracterizada por congestão capilar, edema intersticial e alveolar e hemorragia intra-alveolar (Katzenstein et al., 1976; Teplitz, 1976), associado ao acúmulo intra-alveolar de fluido rico em proteína, neutrófilos e macrófagos (Snyder et al., 1990; Meduri, 1996). As membranas hialinas são formadas a partir de proteínas plasmáticas condensadas e restos celulares, e se localizam preferencialmente nos ductos alveolares. Pode-se demonstrar por imuno-histoquímica a presença de imunoglobulinas, fibrinogênio, surfactante e complemento impregnando as membranas hialinas, enquanto pequenas quantidades de fibronectina delineiam a superfície da membrana (Fukuda et al., 1987). Os ductos alveolares dilatados contrastam com alvéolos colapsados, congestos e edematosos. Ultraestruturalmente, observa-se lesão de células endoteliais, espessamento das

junções interendoteliais, aumento do número de vesículas de pinocitose e, nas lesões graves, necrose com ruptura celular, desnudamento da membrana basal e acúmulo de fibrina intravascular (Balk et al., 1983; Albertine, 1985).

A resposta fibroproliferativa inicia-se imediatamente após o início da lesão, sendo caracterizada pela presença de miofibroblastos e seus produtos do tecido conectivo nos espaços aéreos, interstício, bronquíolos respiratórios e paredes microcirculatórias intra-acinares, na tentativa de reparar o dano da barreira alvéolo-capilar (Bellingan, 2002; Santos et al., 2006). Têm sido demonstrado aumento no número de miofibroblastos e produção de pró-colágeno tipos I e III (Chesnutt et al., 1997; Liebler et al., 1998; Meduri et al., 1998b; Pugin et al., 1999) nas fases iniciais da síndrome. Rocco e colaboradores (Rocco et al., 2001) demonstraram, utilizando um modelo de lesão pulmonar aguda em ratos induzido por paraquat, que também ocorre produção de fibras elásticas na fase precoce da LPA, configurando um processo de fibroelastose. Além disso, demonstraram que fibras com alta quantidade de componente microfibrilar (fibras oxitalânicas) eram especialmente importantes, uma vez que sua presença já poderia ser detectada em lesões com alta gravidade.

Na fase fibroproliferativa, células cuboidais recobrem a membrana basal desnudada. Estas células foram caracterizadas como pneumócitos tipo II por apresentarem corpos lamelares intracitoplasmáticos e microvilosidades na superfície, além de serem corados imuno-histoquimicamente para apoproteína presente no surfactante (Fukuda et al., 1987; Sugiyama et al., 1993). Observa-se a presença de células alveolares atípicas, provavelmente originadas das células basais brônquicas residuais (Fukuda et al., 1987) que sofreram diferenciação

escamosa, sendo caracterizadas por grandes núcleos vesiculares com nucléolos proeminentes. Pneumócitos tipo II são capazes de se diferenciar em tipo I em camundongos e, provavelmente, também em humanos (Adamson et al., 1974; Teplitz, 1976). Ocorre proliferação de fibroblastos e miofibroblastos, que migram através das falhas da membrana basal, e são responsáveis pela conversão do exudato em tecido de granulação celular rico em mucopolissacarídeos ácidos, principalmente ácido hialurônico, e posteriormente, pela deposição de colágeno, resultando em fibrose do ducto alveolar, espessamento do septo alveolar e colapso resultante de anormalidades estruturais e funcionais do surfactante, concomitante ao remodelamento da parede alveolar (Tomashefski, 2000; Rocco et al., 2004; Santos et al., 2006).

Quando está presente, a fase fibrótica é caracterizada por um tecido completamente remodelado, com deposição esparsa de colágeno, formando a macroscopia microcistos medindo 1-2 mm de diâmetro, compondo um aspecto de "favos de mel", associados às áreas de fibrose difusa. Frequentemente ocorre bronquiectasia de tração e tortuosidade arterial. Microscopicamente, a parede da unidade alveolar apresenta-se espessada, composta de fibras colágenas (Tomashefski, 2000).

Estas alterações patológicas decorrem da complexa interação entre os mecanismos inflamatórios e de reparo pulmonar. A resposta inflamatória é, necessariamente, um equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios, importantes na eliminação do estímulo inicial que lesa o tecido, e mediadores anti-inflamatórios, os quais ajudam a regular o reparo tecidual (Ingbar, 2000). Porém, essa clara divisão não existe *in vivo*, pois as citocinas pró-inflamatórias precoces

(TNF- α e IL-1 β), que iniciam a resposta pulmonar à lesão tecidual, levam também a resolução e reparo.

O lipopolissacarídeo (LPS), uma macromolécula glicolipídica presente na parede externa de bactérias Gram negativas, é implicado na patogênese da LPA desde 1974, quando a infusão de *Pseudomonas* em ovelhas resultou em aumento da permeabilidade pulmonar e um quadro similar ao edema pulmonar não cardiogênico (Brigham et al., 1974). Meyrick et al. (1983) demonstraram, em ovelhas, alterações funcionais e estruturais dos pulmões após a infusão de endotoxina. Após 15 minutos da infusão, ocorreu aumento na pressão da artéria pulmonar, intensa leucopenia, diminuição da PaO₂ e alterações na mecânica pulmonar com discretas mudanças tanto no débito cardíaco como na pressão atrial esquerda. Trinta minutos após, coincidindo com o pico da hipertensão pulmonar e das alterações na mecânica pulmonar, houve migração de leucócitos para o interstício pulmonar e edema intersticial. Sessenta minutos após a infusão, já havia lesão das paredes dos vasos, lesão das células intersticiais e dos pneumócitos tipo I, e edema perivascular. A ruptura da camada endotelial ocorreu após, aproximadamente, 2 horas, elevando a permeabilidade vascular. O principal efeito da endotoxina nas ovelhas foi o aumento da permeabilidade microvascular do pulmão, que resultou em um edema pulmonar não cardiogênico, que é sabidamente a principal anormalidade na LPA em seres humanos.

Trabalhos experimentais mostram que o LPS modula seus efeitos patológicos através da indução de segundos mensageiros, incluindo as citocinas, via ativação de receptores de sinalização responsáveis por iniciar o sinal de transdução intracelular, denominados *Toll-Like Receptor* (Brightbill et al., 2000).

Os monócitos e macrófagos alveolares, em resposta a toxinas bacterianas, liberam vários mediadores inflamatórios, principalmente TNF- α e a IL-1 β , os quais atuam nas células epiteliais, fibroblastos, células endoteliais, na matriz extracelular e no recrutamento de células circulantes (neutrófilos, plaquetas e linfócitos), resultando em uma segunda via de liberação de citocinas, o que amplia a resposta de defesa do organismo (Ware e Matthay, 2000).

Os neutrófilos são os principais componentes do infiltrado inflamatório na LPA (Abraham, 2003). Os neutrófilos são detectados precocemente no parênquima pulmonar após choque hipovolêmico (Hierholzer et al., 1998), lesão intestinal secundária a isquemia-reperfusão (Terada et al., 1992) ou administração de endotoxinas (Parsey et al., 1998). Além disso, têm um papel importante em mediar o dano do tecido e da microvasculatura pulmonar na LPA. Isto pode ser demonstrado em experimentos onde os neutrófilos são eliminados antes do insulto que leva a LPA. A indução de neutropenia seguida de desafio por endotoxemia ou hemorragia atenua o aumento da permeabilidade vascular e dos índices de injúria pulmonar (Abraham, 2000a).

A exposição dos neutrófilos ao LPS, via ativação de proteínas cinases Akt e p38, resulta no acúmulo nuclear de NF- κ B, e aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias cuja transcrição é dependente do NF- κ B (Shenkar et al., 1999; Abraham, 2003). O NF- κ B é um dímero composto de proteínas da família Rel, e está primariamente retido no citoplasma das células em repouso por interações não-covalentes com inibidores I κ B (Senftleben et al., 2002). Apesar de se acreditar inicialmente que as moléculas de I κ B estavam presentes exclusivamente no citoplasma das células, evidências recentes mostram que elas

estão presentes dentro e fora do núcleo e tem um importante papel na regulação da atividade dos dímeros de NF- κ B no núcleo e no citoplasma (Birbach et al., 2002). A interação do LPS ou de citocinas com receptores da membrana dos neutrófilos promove a translocação do NF- κ B para o núcleo da célula, onde se liga em regiões promotoras de vários genes responsáveis pela produção de citocinas e outras moléculas reguladoras que participam do desenvolvimento e progressão da LPA, tais como molécula de adesão intercelular -1 e óxido nítrico sintase induzida (Abraham, 2000a).

A interleucina 8 é uma quimiocina que estimula o movimento dos leucócitos e regula sua migração do sangue para os tecidos. As quimiocinas pertencem a uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas, e esse nome deve-se à contração do nome "citocina quimiotáxica". Atualmente, já foram caracterizadas mais de 50 quimiocinas que exibem um resíduo de cisteína aminoterminal altamente conservado e podem ser divididas em 4 classes: CXC, CC, C e CX3C, divisão esta baseada na existência ou não de um resíduo de aminoácido não conservado entre os dois primeiros aminoácidos de cisteína (Loetscher et al., 2001). Na inflamação, as quimiocinas CXC atuam principalmente em neutrófilos e as quimiocinas CC atuam em monócitos, linfócitos e eosinófilos.

As quimiocinas são produzidas por leucócitos, células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos. Sua secreção em muitas dessas células é induzida por endotoxinas e por outras citocinas inflamatórias, principalmente TNF- α e IL-1. Sua atividade como quimioatraente para leucócitos faz com que recrutem células de defesa para o sítio de infecção. O recrutamento de neutrófilos resulta de uma

seqüência de ações das quimiocinas sobre eles. As quimiocinas provocam alterações rápidas nos neutrófilos, resultando na formação de lamelopodos, estimulam a polimerização e a despolimerização dos filamentos de actina, levando ao movimento dos neutrófilos e sua migração através de um gradiente químico de citocina. As quimiocinas também aumentam a afinidade das integrinas leucocitárias por seus ligantes no endotélio; dessa maneira a migração dos neutrófilos é realizada pelas quimiocinas em conjunto com as células de adesão. As primeiras quimiocinas identificadas foram descritas como citocinas pró-inflamatórias, pois são expressas em condições de inflamação e atraem leucócitos que medeiam reações inflamatórias (Hasegawa et al., 2001), sendo que as duas maiores classes incluem as α -quimiocinas que recrutam polimorfonucleares e β -quimiocinas que recrutam monócitos e linfócitos (Martin et al., 1999).

Em ratos e camundongos, os roedores mais utilizados como modelos de doenças humanas, as mais importantes quimiocinas CXC identificadas são o KC (citocina quimioatraente de polimorfonucleares) e a MIP-2 (proteína inflamatória de macrófago 2). O KC possui 47,2% de homologia com a IL-8 humana e tem sido assim referido na maioria dos estudos. Sua descoberta ocorreu em 1983, quando Cochran et al. (1983) clonaram em camundongos BALB/c uma seqüência de genes que eram regulados pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Esses genes foram denominados de KC e JE, os quais foram induzidos como consequência do crescimento celular, porém eram diretamente regulados pelo PDGF. Em 1994, Bozic e colaboradores, estudando a expressão e caracterização biológica de um receptor murínico para IL-8 e seus ligantes,

verificaram que o KC, um produto dos fibroblastos de camundongos induzido pelo PDGF, ligava-se com afinidade aos neutrófilos. Além disso, os neutrófilos humanos também se ligam ao recombinante KC (Bozic et al., 1994). Frevert e colaboradores (1995), utilizando instilação intratraqueal de rKC em ratos estimulados com LPS, verificaram no BAL um influxo acentuado de polimorfonucleares para o interior da via aérea e que a utilização de anti-KC reduzia esta atividade quimiotática em 71%. Estes autores concluíram que o KC é o principal, porém não é o único mediador de ativação e recrutamento de polimorfonucleares durante uma inflamação mediada por LPS.

As quimiocinas parecem ter um papel fundamental em todas as fases da LPA (Goodman et al., 1996), sendo a IL-8 a citocina mais estudada da família CXC. A IL-8 é a principal citocina atuante na quimiotaxia de neutrófilos para os pulmões e tem sido implicada como um marcador potencial do desenvolvimento da LPA em pacientes de alto risco. A importância da IL-8 no desenvolvimento da LPA foi estudada por Anderson e colaboradores (1992) através da análise do BALF de pacientes que sofreram trauma: altas concentrações de IL-8 foram encontradas já nas primeiras horas. Verificou-se uma contribuição significativa da IL-8 no seqüestro, migração e ativação de neutrófilos. Uma fonte de IL-8 nos pacientes com LPA era o macrófago alveolar, apesar de outras células da barreira alvéolo-capilar estarem implicadas na elevação dos níveis de IL-8. Um aspecto importante desses estudos foi identificar que elevados níveis de IL-8 precedem o aumento do número de neutrófilos no BALF. Além disso, a presença de níveis elevados de IL-8 e de neutrófilos no BALF de pacientes com LPA é correlacionada com alta mortalidade (Miller et al., 1992; Pittet et al., 1997).

Já a IL-6, clonada em 1986, possui atividades pleiotrópicas tanto no sistema imune quanto no sistema hematopoiético, onde induz a diferenciação e desenvolvimento de células B, células T, células mielóides, megacariócitos, osteoclastos, células neurais, hepatócitos e também atua como fator de crescimento das células tronco hematopoiéticas. Várias outras substâncias são pertencentes à família da IL-6: a IL-11, o fator neutrofílico ciliar (CNTF), a cardiotropina (CT-1), o oncostatin M (OSMM), o fator inibitório de leucemia (LIF) e o estimulante de células B neutropina 1 fator 3. Estas substâncias compartilham uma via de transdução comum, o gp 130, explicando desse modo o mecanismo molecular de redundância entre elas em diferentes tecidos (Streetz et al., 2001).

Dados experimentais demonstram um papel para o gp 130 na proliferação e diferenciação celular e na regulação da apoptose, principalmente por seus efeitos anti-apoptóticos (Fukuda et al., 1996; Fukuda et al., 1998; Raz et al., 1999). A ativação do STAT3 (uma das vias de ativação celular do gp 130) leva a ativação de genes anti-apoptóticos em célula B, protegendo-as da apoptose dependente de Fas (Catlett-Falcone et al., 1999). Resultados similares foram encontrados em células T de camundongos, deficientes de STAT3 (Takeda et al., 1998), em hepatócitos, onde a IL-6 preveniu a apoptose, induzida por TGF- β (Chen et al., 1999).

A IL-6 é sintetizada por fagócitos mononucleares, células vasculares endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a patógenos ou outras citocinas, principalmente IL-1 e TNF- α . Sua principal atividade é o sinergismo com a IL-1 e o TNF- α na coestimulação de respostas imunes, sendo a mais importante citocina na indução da síntese de proteínas da fase aguda pelos

hepatócitos, contribuindo, dessa maneira, para os efeitos sistêmicos da inflamação. Isto foi demonstrado por Gauldie et al. (1988) ao comprovarem a produção de IL-6 no pulmão por fibroblastos observando que sua liberação pode ser estimulada inúmeras vezes pela IL-1 e o TNF- α , tendo explicado, assim, a indução da síntese de proteínas de fase aguda no fígado durante o processo de inflamação pulmonar. Sua atuação como reguladora dos níveis de TNF- α foi demonstrada tanto em camundongos como em ratos, podendo representar um mecanismo de feedback negativo endógeno, que inibe a inflamação aguda mediada por citocinas e iniciada por endotoxina (Aderka et al., 1989). Esse fato foi corroborado por Ulich et al. (1991), demonstrando que a injeção intratraqueal de IL-6 em ratos inibiu fortemente a inflamação aguda induzida por LPS.

I.2. LPA DE ORIGEM DIRETA E INDIRETA

Apesar das várias causas da LPA resultarem em alterações patológicas uniformes tardiamente, caracterizadas como dano alveolar difuso (Tomashefski, 2000), várias evidências têm indicado que a fisiopatologia na fase precoce da LPA pode diferir de acordo com o tipo de insulto primário: se diretamente ao epitélio alveolar, ou indiretamente, por lesão endotelial (Pelosi et al., 2003; Menezes et al., 2005, Rocco et al., 2005; Santos et al., 2006).

A importância da lesão epitelial no desenvolvimento e recuperação da LPA tem sido bem estabelecida (Wiemer-Kronish et al., 1991; Pittet et al., 1997) e o grau de lesão epitelial alveolar é um importante fator para predizer a evolução clínica da síndrome (Matthay et al., 1990; Ware e Matthay, 2000). O epitélio alveolar normal é composto por dois tipos celulares: pneumócitos tipo I, que

representam 90% da superfície alveolar, sendo facilmente lesados; e pneumócitos tipo II, cujas principais funções são produção de surfactante e transporte de íons. A perda da integridade epitelial na LPA acarreta várias conseqüências: (1) em condições normais, a barreira epitelial é menos permeável que a endotelial (Wiener-Kronish et al., 1991), sendo que a lesão epitelial pode contribuir significativamente para formação de edema alveolar; (2) lesão de pneumócitos II interrompe o transporte normal de fluidos, dificultando a remoção de exudato do espaço alveolar (Sznajder, 1999), bem como reduz a produção e o *turnover* de surfactante, contribuindo para anormalidades decorrentes da falta do mesmo (Greene et al., 1999); (3) a perda da barreira epitelial pode levar ao choque séptico em pacientes com pneumonia bacteriana (Kurahashi et al., 1999). Desta forma, descreveu-se que na LPA direta havia predomínio de consolidação alveolar, com preenchimento do espaço alveolar por células inflamatórias, restos celulares e edema, sendo observado na tomografia computadorizada um aumento homogêneo na atenuação pulmonar com obliteração das margens broncovasculares, podendo existir broncograma aéreo (Austin et al., 1996).

Em contrapartida, a lesão do endotélio vascular levaria ao aumento da permeabilidade desta barreira, proporcionando a formação de edema intersticial, com aumento do peso do pulmão (“teoria da esponja”) e conseqüente colapso do espaço alveolar (Gattinoni et al., 1998).

Esta hipótese tem sido confirmada em estudos experimentais e de necropsia. Em modelos experimentais de LPA causada pela administração de endotoxina de *E. coli*, a lesão direta resulta em dano alveolar caracterizado pela presença de edema, fibrina, colágeno, e agregados de neutrófilos no interior dos

espaços alveolares, enquanto na lesão indireta ocorre predomínio de congestão microvascular, edema intersticial e dano alveolar menos grave (Brighan et al., 1986). Hoelz e colaboradores, analisando a microscopia de 38 necrópsias, demonstraram haver um predomínio de colapso alveolar, exudato fibrinoso e edema da parede alveolar na LPA cuja lesão primária acometia diretamente o epitélio alveolar quando comparado com a lesão por via indireta (Hoelz et al., 2001).

1.3. LPA POR VIA DIRETA E INDIRETA SÃO SÍNDROMES DIFERENTES

O comportamento mecânico do sistema respiratório na fase aguda da LPA e a resposta à terapêutica ventilatória são diferentes se a lesão ocorre inicialmente por via direta ou indireta. Neste contexto, Gattinoni e colaboradores evidenciaram um aumento similar na elastância estática do sistema respiratório (Est,rs) tanto no grupo com LPA direta como na indireta (Gattinoni et al., 1998). No entanto, na LPA direta a elevação da Est,rs ocorria às custas do grande aumento observado na elastância estática pulmonar (Est,L). A relação $Est,L/Est,rs > 0,5$ determinaria o aumento da pressão transpulmonar (P_L), uma vez que:

$$P_L = Paw \cdot Est,L/Est,rs$$

onde Paw é a pressão na abertura da via aérea.

No entanto, na LPA indireta, o aumento da Est,rs seria devido tanto ao aumento na Est,L como na elastância estática da parede torácica (Est,w), de modo que a relação $Est,L/Est,rs$ seria menor ou igual a 0,5. Portanto, não haveria um grande aumento na pressão transpulmonar.

Este mesmo grupo de pesquisadores (Gattinoni et al., 1998) sugeriu que a pressão positiva ao final da expiração (PEEP) poderia atuar na fase precoce da LPA através de dois diferentes mecanismos. A PEEP poderia aumentar a elastância por provocar o estiramento regional das unidades alveolares que já estariam abertas, ou manteria as unidades alveolares abertas ao final da expiração, desta forma diminuindo a elastância. Da mesma forma, Pelosi e colaboradores, ao aplicarem manobras de recrutamento com três suspiros sucessivos e pressão de platô de 45 cmH₂O demonstraram que na LPA indireta houve maior redução do *shunt* alveolar e melhora da PaO₂ do que na lesão direta (Pelosi et al., 1999).

Alguns autores têm sugerido que o comportamento radiológico da LPA é diferente na dependência da sua etiologia. Goodman e colaboradores (Goodman et al., 1999) analisaram prospectivamente pacientes na fase precoce da LPA direta (n=22) e indireta (n=11), e constataram predomínio de opacificação simétrica em vidro fosco (Austin et al., 1996) e consolidação dorsal (atelectasia) na LPA indireta; enquanto a LPA direta tendia a ser assimétrica, com consolidações parenquimatosas densas e opacificações em vidro fosco nas mesmas proporções. Winer-Muran e colaboradores (Winer-Muran et al., 1998), Desai e colaboradores (Desai et al., 1999) e Rouby e colaboradores (Rouby et al., 2000) encontraram resultados similares.

Por outro lado, Desai e colaboradores (Desai et al., 2001) estudaram 41 pacientes com LPA direta (n=16) e indireta (n=25) com o objetivo de prever a etiologia da síndrome baseado no padrão da tomografia computadorizada (TC). O padrão típico da LPA foi encontrado mais frequentemente na etiologia indireta

(72% versus 31%). No entanto, quando cada TC foi analisada individualmente, o padrão típico da LPA não foi relacionado com a causa da síndrome. Os autores concluíram que somente os dados da TC não permitem a identificação da via de lesão (direta versus indireta) da LPA.

Estes estudos que utilizaram a TC como fonte de diagnóstico etiológico apresentaram algumas limitações (Gattinoni et al., 2001): a) todos utilizaram um pequeno número de pacientes; b) o tempo entre o início da LPA e a realização do exame não foi uniforme e os parâmetros ventilatórios variaram de um estudo para outro; c) o grupo de LPA indireta incluiu tanto pacientes com doença abdominal como pacientes no pós-operatório de cirurgias cardíacas, no qual o colapso do lobo inferior esquerdo é mais freqüente e d) lesões diretas e indiretas podem coexistir, resultando em um padrão morfológico difícil de interpretar.

Recentemente, muitos autores têm investigado as várias diferenças fisiopatológicas entre a LPA direta e indireta. Menezes e colaboradores desenvolveram um modelo murino de LPA direta e indireta com mesmo grau de lesão funcional, e demonstraram que, apesar das alterações na mecânica respiratória terem sido similares, a resposta inflamatória e as alterações ultraestruturais do parênquima pulmonar são mais intensas após a injúria direta do epitélio alveolar (Menezes et al., 2005). Além disso, Santos e colaboradores, ao analisarem a evolução temporal da LPA direta e indireta, demonstraram que as alterações funcionais na fase precoce da LPA não eram capazes de prever o comportamento do remodelamento pulmonar (Santos et al., 2006). Concluíram que a injúria direta ao epitélio alveolar acarretava fibroelastogênese, enquanto

que a lesão inicial do endotélio vascular (indireta) induziu apenas fibrose, que foi reparada durante o curso da lesão pulmonar.

Além disso, vários autores têm sugerido que a resposta terapêutica pode variar entre as síndromes. Suntharalingam e colaboradores (2001) avaliaram 81 pacientes com mesma gravidade, caracterizada pela ausência de diferença estatística na pontuação do escore APACHE II, LIS e relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, e demonstraram que a LPA direta estava relacionada a um maior tempo de ventilação mecânica (17 x 9 dias) e maior resistência ao recrutamento quando comparado com o grupo de causas indiretas (Suntharalingam et al., 2001). Após 6 meses de acompanhamento, ambos os grupos demonstraram um padrão restritivo similar no estudo da função pulmonar. Apesar destes autores não demonstrarem um aumento estatisticamente significativo da mortalidade, o que pode ser explicado pelo pequeno número de pacientes utilizados neste estudo, o tempo de ventilação mecânica foi um importante indicador de pior prognóstico.

A prostaciclina (PGI_2) inalada, sugerida como alternativa ao óxido nítrico devido aos seus efeitos colaterais mais tênues e a facilidade de administração (Scheeren et al., 1996; Walmrath et al., 1996), alcança a musculatura lisa vascular por difusão nos espaços aéreos, induzindo vasodilatação pulmonar das unidades alveolares ventiladas e redistribuição do fluxo sanguíneo pulmonar de regiões não ventiladas. Domenighetti e colaboradores estudaram os efeitos da nebulização com PGI_2 na oxigenação e hemodinâmica pulmonares na LPA direta e indireta (Domenighetti et al., 2001). Concluíram que a nebulização com PGI_2 foi efetiva somente na LPA indireta, o oposto ocorrendo na LPA direta, sendo observado até mesmo uma piora da troca gasosa neste último grupo. Rialp e

colaboradores evidenciaram que a redistribuição do fluxo pulmonar induzida por óxido nítrico poderia ser otimizada quando em associação com a posição prona na LPA causada por lesão direta do epitélio alveolar (Rialp et al., 2001). A LPA indireta não demonstrou benefício da associação do óxido nítrico com a posição prona, talvez porque o recrutamento já tenha ocorrido totalmente apenas com a modificação da posição. Neste contexto, Lim e colaboradores analisaram os efeitos da posição prona na LPA direta e indireta e observaram melhora da relação PaO_2/FiO_2 , definida como um aumento de 40% em relação ao valor basal, na LPA indireta (Lim et al., 2001). Após 30 minutos de posição prona, esta melhora ocorreu em 63% dos pacientes com LPA indireta; contudo, nenhum benefício adicional foi observado após 2 horas. Em contrapartida, 23% dos pacientes com LPA direta alcançaram melhora na relação PaO_2/FiO_2 em 30 minutos e 29% dos pacientes apresentaram melhora da oxigenação em 2 horas. Portanto, a melhora da troca gasosa tem um efeito adicional na LPA direta em tempos mais prolongados.

Apesar do desenvolvimeto de várias estratégias terapêuticas, os resultados na melhora da taxa de mortalidade na LPA continuam desanimadores (Ware e Matthay, 2000). Neste contexto, os corticosteróides, por serem potentes agentes antiinflamatórios, foram testados desde o início da definição da LPA/SDRA, porém sempre com resultados controversos. Ao mesmo tempo, as várias etiologias da LPA nunca foram consideradas. Uma vez que a patogênese da LPA varia se a injúria do parênquima pulmonar é direta ou indireta (Gattinoni et al., 1998; Pelosi et al., 1999; Menezes et al., 2005; Santos et al., 2006), é

possível que os corticosteróides atuem diferentemente dependendo da etiologia da lesão.

I.4. O USO DO CORTICOSTERÓIDE NA LPA

Os corticosteróides são transportados no plasma ligados a transcortina (globulina ligadora de corticosteróide) e a albumina ou, numa quantidade proporcionalmente menor, na forma livre, metabolicamente ativa. As moléculas de corticosteróides livres cruzam a membrana plasmática chegando ao citoplasma, onde se ligam ao seu receptor específico, o receptor de glicocorticosteróide (GR). O GR está presente no citoplasma de praticamente todas as células humanas, existindo como um heterocomplexo que contém o GR em associação com duas subunidades de *heat shock protein* (hsp) 90, uma subunidade de hsp56, uma subunidade da hsp70, e a uma proteína acidófila de 23 kD (Jantz et al., 1999). Após a ligação do hormônio, ocorre a dissociação do complexo GR, e o GR ativado é translocado ao núcleo, onde pode se ligar a elementos responsivos ao glicocorticosteróide (GRE) no DNA ou pode interagir com fatores de transcrição. Dependendo do elemento regulatório específico no qual o GR se liga, a taxa de transcrição de RNAm específicos podem ser induzidos (*upregulation*) ou suprimidos (*downregulation*) (Jantz et al., 1999). Além dos efeitos mediados pelo GRE localizado na região promotora do DNA e as interações com outros fatores de transcrição, o GR ativado pode alterar a estabilidade do RNAm (Shaw et al., 1986; Kern et al., 1988).

Os corticosteróides inibem a transcrição de várias citocinas que são importantes nas doenças inflamatórias, incluindo interleucinas (IL-1, IL-3, IL-4, IL-

5, IL-6, IL-8), fator de necrose tumoral (TNF- α) e fator estimulante de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF) (Barnes, 1996). Os corticosteróides também interagem com os fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B (Yang-Yen et al., 1990; Jantz et al., 1999). A transcrição destes fatores está envolvida na estimulação de um número de produtos gênicos que possuem um papel central na inflamação, incluindo IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF e RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*) (Jantz et al., 1999). Por interferir com estes fatores de transcrição, os corticosteróides podem inibir a expressão destes genes. A transcrição do gene IL-2 é predominantemente regulado pelo fator nuclear de células T ativadas (NF-AT), o qual é dependente de um fator nuclear que parece ser o AP-1, para formar um complexo transcricional (Northrup et al., 1993; Thompson et al., 1993). Desta forma, os corticosteróides podem inibir a transcrição do gene IL-2 indiretamente por ligar-se ao AP-1 (Paliogianni et al., 1993). Os corticosteróides também aumentam a degradação de RNAm codificado para IL-1 β , IL-6 e GM-CSF (Shaw et al., 1986; Kern et al., 1988).

Os corticosteróides possuem um importante efeito numa variedade de mediadores inflamatórios. A Óxido Nítrico Sintase (NOS) pode ser induzida por várias citocinas, resultando no aumento da produção de Óxido Nítrico (Jantz et al., 1999). A indução de uma forma da NOS é inibida pelo corticosteróide, presumivelmente pelo efeito no NF- κ B o qual é um importante fator de transcrição na regulação da NOS induzida (Xie et al., 1994). Os corticosteróides inibem o gene que codifica a ciclooxigenase induzida (COX-2), o qual também parece ser dependente da ativação do NF- κ B (Newton et al., 1995). A transcrição de genes

da Fosfolipase A₂ citossólica, que é induzida por citocinas e clivada do ácido araquidônico para produzir os precursores dos leucotrienos e das prostaglandinas, também é inibida pelos corticosteróides (Jantz et al., 1999). Fatores ativadores de plaquetas ativam a AP-1 ligada a células inflamatórias e também podem ser inibidos pelos corticosteróides. Além disso, os corticosteróides também inibem a síntese de endotelina-1, peptídeo que possui propriedade broncoconstrictora no pulmão e nas células epiteliais das vias aéreas (Vittori et al., 1992).

Os corticosteróides aumentam a transcrição do gene do receptor β_2 -adrenérgico e são capazes de prevenir a dessensibilização e a supressão destes receptores (Barnes et al., 1995). Também inibem a transcrição do gene da molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e E-selectina (Van de Stolpe et al., 1993). Ressalta-se que a expressão da ICAM-1 é dependente da ativação do NF- κ B.

A primeira tentativa de usar os corticosteróides para diminuir a resposta inflamatória na sepse data de 1963 (Group CS, 1963). Apesar de seu exato mecanismo não ser totalmente esclarecido, ele é capaz de inibir uma série de mediadores inflamatórios (Conner et al., 2000), sendo implicado na redução da morbi-mortalidade em modelos animais se administrado antes ou simultaneamente à indução de sepse e lesão pulmonar por bactéria (Pitcairn et al., 1975; Modig et al., 1985), endotoxina (Brigham et al., 1981) e aspiração ácida (Toung et al., 1976).

Em 1976, Schumer e colaboradores sugeriram que altas doses de corticosteróides poderiam reduzir a mortalidade em pacientes com sepse

(Schumer et al., 1976). No entanto, este trabalho foi criticado por apresentar uma série de falhas: somente uma parte dos dados utilizados no estudo era randomizada e prospectiva, enquanto outra foi obtida retrospectivamente, foram usados diferentes antibióticos e a dose do corticosteróide foi diferente para cada paciente.

Em contrapartida, vários estudos clínicos, randomizados, controlados e prospectivos, examinaram a efetividade do corticosteróide no tratamento da LPA. Sprung e colaboradores, em 1984, (Sprung et al., 1984) e outros autores (Veterans Administ., 1987; Luce et al., 1988), utilizando doses de até 30 mg/kg de metilprednisolona na fase precoce da sepse, não encontraram diferenças na mortalidade de pacientes sépticos em relação ao grupo placebo. Estes estudos não comprovaram nenhum benefício dos corticosteróides na sepse e no choque séptico, podendo até piorar seu curso clínico, em função de seus efeitos colaterais, tais como: pneumonia nosocomial, deiscência de sutura, ruptura gástrica e paralisia prolongada (Braude et al., 1992; Hooper et al., 1996).

Bone e colaboradores (1987) desenvolveram um estudo multicêntrico, randomizado e duplo cego para avaliar se a terapia com metilprednisolona seria capaz de prevenir o desenvolvimento de SDRA em pacientes com alto risco. Os autores randomizaram 304 pacientes com sepse para receberem metilprednisolona (MP) na dose de 30 mg/kg a cada 6 horas num total de 4 doses ou placebo, sendo o tratamento instituído dentro de 2 h do início da sepse. Os resultados deste estudo demonstraram uma tendência ao aumento da incidência de SDRA no grupo tratado com MP (32% versus 25%, $p = 0,10$). Estes autores sugeriram a ocorrência do aumento da mortalidade particularmente em um

subgrupo de pacientes com sepse associada à insuficiência renal que receberam corticosteróide. Dos pacientes que desenvolveram SDRA, apenas 31% tratados com MP tiveram a resolução clínica da síndrome em 14 dias (15/50 pacientes), enquanto no grupo placebo a melhora clínica foi observada em 61% dos pacientes (23/38). A mortalidade em 14 dias nos pacientes que desenvolveram SDRA foi maior no grupo tratado com MP do que no placebo [52% (26/50) versus 22% (8/22), $p = 0,004$].

Bernard e colaboradores (1987), por outro lado, desenvolveram um estudo controlado, randomizado e duplo cego para avaliar o efeito do corticosteróide em altas doses por um tempo limitado. Os autores randomizaram 99 pacientes adultos com até 30 h de início da SDRA para receber MP (30 mg/kg a cada 6 h por 4 doses) ou placebo. Estes grupos foram comparados quanto a resolução da síndrome (definida como melhora do infiltrado na radiografia de tórax e na oxigenação), mortalidade em 45 dias, *shunt* pulmonar e complacência do sistema respiratório. Este estudo, no entanto, falhou em demonstrar qualquer diferença entre os grupos MP e placebo. Evidenciaram ainda uma maior tendência a infecção no grupo que recebeu esteróide [16% (8/50 pacientes) versus 10% (5/49), $p = 0,6$], além de maior incidência de hiperglicemia ($p < 0,01$).

O benefício do corticosteróide vem sendo investigado na fase fibroproliferativa da LPA (Brun-Buisson et al., 1998; Meduri et al., 1991). Este agente terapêutico é capaz de inibir a ativação de fatores de transcrição (Auphan et al., 1995; Almawi et al., 1996) e citocinas pró-inflamatórias (Meduri et al., 1995a; Meduri et al., 1995b). Num estudo com 27 pacientes com SDRA, Meduri e colaboradores observaram um alto nível plasmático de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8

no primeiro dia da SDRA, mantendo-se persistentemente elevado nos pacientes que evoluíram para óbito (Meduri et al., 1995a). Aqueles que sobreviveram apresentaram um pico de liberação de citocinas menor no primeiro dia, seguida de rápido declínio no curso da doença. Estes mesmos autores (Meduri et al., 1995a) examinaram o efeito do corticosteróide nos níveis de citocinas presentes no plasma e no fluido do lavado broncoalveolar (BALF), correlacionando seus achados com o escore de Murray, índices de permeabilidade endotelial e mortalidade. Cinco pacientes foram classificados como rapidamente responsivos ao tratamento, enquanto dois responderam tardiamente e outros dois não responderam. Sete dias após o início do tratamento, ocorreu redução significativa nos níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6 nos pacientes respondedores rápidos e nos tardios. A IL-1 β foi reduzida em 5 dias nos respondedores rápidos e em 10 dias nos tardios. Naqueles pacientes responsivos ao tratamento, a melhora nos escores prognósticos foi correlacionada com a redução dos níveis de citocinas plasmáticas e do BALF.

Em 1994, Meduri e colaboradores demonstraram uma melhora significativa na função pulmonar com o uso de baixas doses de corticosteróide na fase tardia da SDRA (Meduri et al., 1994). A biópsia pulmonar realizada nos pacientes que receberam corticosteróide revelou arquitetura alveolar intacta e nenhuma evidência de fibroproliferação subintimal. No entanto, este trabalho recebeu muitas críticas por ser um estudo não controlado e pelo fato do tratamento ter sido iniciado 2 semanas após o início da SDRA, momento no qual a maioria dos pacientes irá reverter a insuficiência respiratória com ou sem corticosteróide. Em 1997, Meduri e colaboradores demonstraram que o tratamento prolongado com

corticosteróide foi capaz de reduzir significativamente a mortalidade no grupo que recebeu metilprednisolona (0 de 16 pacientes) em comparação com o grupo placebo (5 de 8 pacientes) (Meduri et al., 1997). Evidenciaram também melhora na relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e diminuição no escore de disfunção orgânica múltipla entre os pacientes tratados com corticosteróide. Os autores especularam que a remoção precoce do corticosteróide utilizado em altas doses em estudos prévios poderia ser a causa da ausência do seu benefício. Uma das principais críticas a este trabalho está no fato de que pacientes que não responderam precocemente ao tratamento foram retirados do estudo.

Tem sido demonstrado que os corticosteróides podem prevenir a deposição excessiva do colágeno e aumentar o seu *turnover*, podendo evitar a fibrose e a restrição respiratória observadas na fase fibroproliferativa da SDRA (Meduri et al., 1998b). O aumento dos níveis do pró-colágeno tipo III, um marcador biológico para síntese de colágeno, é freqüentemente detectado no BALF de pacientes com SDRA e está associado com o aumento da mortalidade (Chesnutt et al., 1997). Neste contexto, Meduri e colaboradores (Meduri et al., 1998b) investigaram 29 pacientes com SDRA através da medida do pró-peptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo I (PCI) e III (PCIII) no plasma e no BALF, correlacionando estes resultados com o escore prognóstico de Murray e escore de disfunção orgânica múltipla. Os pacientes foram classificados em responsivos ao tratamento caso fosse observado uma redução no escore de Murray durante a primeira semana de tratamento com metilprednisolona. No primeiro dia da SDRA, todos os pacientes apresentaram níveis elevados de PCI e PCIII. No sétimo dia de doença, as concentrações plasmáticas de PCI e PCIII não foram alteradas nos

responsivos, ao passo que aumentaram significativamente naqueles que não sobreviveram. Nesta fase, os pacientes que apresentaram níveis plasmáticos de PCI < 100 ng/mL apresentaram uma probabilidade de sobrevida 2,5 vezes maior e pacientes com níveis plasmáticos de PCIII > 25 ng/mL tiveram risco 9 vezes maior de óbito. O uso de metilprednisolona acarretou uma redução rápida e sustentada dos níveis de PCI e PCIII no plasma e no BALF. Além disso, o uso do corticosteróide levou a uma melhora da relação PaO_2/FiO_2 , resultando na diminuição dos níveis da PEEP, reduzindo também os níveis plasmáticos de alguns marcadores de síndrome de disfunção orgânica múltipla, tais como creatinina e bilirrubina, e a temperatura corporal destes pacientes.

Estes resultados levaram Meduri e colaboradores a desenvolver um estudo randomizado com 24 pacientes com SDRA que não melhoraram clinicamente nos primeiros 7 dias da doença (Meduri et al., 1998a). Quatro pacientes, pertencentes ao grupo placebo, que não melhoraram após 10 dias da randomização, foram tratados de forma alternativa. Pacientes submetidos ao tratamento com metilprednisolona (2 mg/kg durante 2 semanas, seguido de redução da dose pela metade a cada semana) apresentaram melhora no escore de Murray pelo aumento da relação PaO_2/FiO_2 (262 ± 19 x 148 ± 35 , $p < 0,01$), no escore de disfunção orgânica múltipla e possibilidade de extubação (7 x 0, $p = 0,05$). A mortalidade na Unidade de Terapia Intensiva e hospitalar foram maiores no grupo placebo (62% x 0%, $p = 0,02$; e 62% x 2%, $p = 0,03$). No entanto, este estudo é passível de muitas críticas, tais como: a) existiram diferenças entre os grupos placebo e MP, com uma maior proporção de fatores de riscos para SDRA direta (como pneumonia ou aspiração) no grupo placebo (6/8, 75%) do que no MP

(9/16, 56%); b) no início do tratamento, os pacientes do grupo placebo tiveram uma menor relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (141 versus 161 mmHg), maior necessidade de níveis elevados de pressão positiva ao final da expiração (PEEP) (14 versus 12 cmH_2O), maior escore de lesão pulmonar (LIS) (3,3 versus 3,0) e maior escore de disfunção orgânica (2,5 versus 1,5). Uma vez que a presença de fatores de risco diretos ou indiretos e o grau de alterações nas medidas fisiológicas e de disfunção orgânica influenciam a mortalidade (Monchi et al., 1998), eles são potentes confundidores em favor de uma melhor evolução para o grupo que recebeu o corticosteróide. Além disso, o estudo foi interrompido precocemente com número pequeno da amostra.

Em função dos resultados promissores do estudo de Meduri e colaboradores (Meduri et al., 1998a) e para vencer eventuais limitações, em 1999, o *National Institute of Health* (NIH) iniciou um estudo clínico intitulado *The "Late Steroid Rescue Study (LaSRS): The Efficacy of Corticosteroids as Rescue Therapy for the Late Phase of Acute Respiratory Distress Syndrome"*. O estudo LaSRS (conhecido como "Lazarus") compara o efeito do corticosteróide com placebo na fase tardia da SDRA, isto é, após 7 dias do início da síndrome. O *end point* primário foi a mortalidade em 60 dias. O *end point* secundário incluiu o número de dias livres de ventilação mecânica ou de disfunção orgânica. O LaSRS foi desenhado inicialmente para incluir 400 pacientes, sendo reduzido posteriormente para 200. Este estudo foi interrompido antes do seu término porque os pacientes tratados com corticosteróide retornavam mais freqüentemente à prótese ventilatória devido à fadiga muscular por neuropatia induzida pelo esteróide.

Até o momento, o consenso americano-europeu reconhece o benefício dos corticosteróides apenas em dois subgrupos de pacientes (Artigas et al., 1998). O primeiro é formado por pacientes com alto risco para síndrome de embolia gordurosa (fraturas de ossos longos), nos quais o corticosteróide administrado profilaticamente diminui o risco de insuficiência respiratória (Kallenbach et al., 1987). Além destes, pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) que apresentam pneumonia por *Pneumocystis carinii* também se beneficiam do tratamento com corticosteróide. Bozette et al. (Bozette et al., 1990), estudando 251 pacientes com pneumonia por *P. carinii* e hipóxia, observaram no grupo que recebeu corticosteróide concomitantemente a antibioticoterapia uma redução de aproximadamente 50% na incidência de hipoxemia, no uso de ventilação mecânica e na mortalidade.

II. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Apesar dos recentes avanços no entendimento de seus mecanismos fisiopatológicos, a Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) continuam sendo um importante problema nas Unidades de Terapia Intensiva devido a alta taxa de mortalidade (40-60%). As séries complexas de eventos inflamatórios que resultam na LPA / SDRA ocorrem como resultado de lesão pulmonar direta (pneumonia, aspiração de conteúdo gástrico, inalação tóxica, contusão pulmonar) ou indireta (sepse, trauma não torácico, hipertransfusão) (Bernard et al., 1994). Os princípios gerais de tratamento da síndrome incluem a reversão da causa subjacente, estratégias ventilatórias para manter a oxigenação e evitar uma maior lesão pulmonar, além do controle volêmico. No entanto, a mortalidade na LPA / SDRA permanece elevada, sendo a maioria das mortes causada por sepse e Síndrome de Disfunção Orgânica Múltipla (MODS) (Kollef et al., 1995; Rocco et al., 2005). Apesar das pesquisas se multiplicarem, nenhuma modalidade terapêutica específica, por si só, foi capaz de reduzir a morbidade e mortalidade na LPA / SDRA (Luce, 1998).

O uso do corticosteróide no tratamento da LPA / SDRA tem sido objeto de interesse desde a descrição desta síndrome (Ashbaugh et al., 1967) e seus resultados sempre se mostraram controversos. Apesar do exato mecanismo de ação dos esteróides na LPA / SDRA não estar totalmente elucidado, os corticosteróides são capazes de inibir potentes mediadores inflamatórios e melhoram a morbidade e mortalidade em modelos experimentais de lesão

pulmonar aguda induzida por bacteremia (Pitcairn et al., 1975; Modig et al., 1985), endotoxemia (Thomas et al., 1968) e aspiração do conteúdo gástrico (Toung et al., 1976).

A terapia com corticosteróide na LPA / SDRA foi estudada em três diferentes situações: (1) prevenção em pacientes com alto risco de evoluir com LPA ou SDRA (Weigelt et al., 1985; Bone et al., 1987); (2) na fase precoce da SDRA com altas doses e tempo reduzido (Bernard et al., 1987); (3) na terapia prolongada nos casos refratários a terapia convencional (Meduri et al., 1998a). Nas duas primeiras situações, ao se utilizar altas doses dos esteróides (30 mg/kg a cada 6h), nenhum benefício foi demonstrado ou até mesmo ocorreu piora nos pacientes submetidos a corticoterapia. Por outro lado, ao estudar o uso de 2 mg/kg a cada 6h de metilprednisolona na fase tardia da LPA, Meduri et al. (1998a) demonstraram uma redução significativa na mortalidade do grupo que recebeu o corticosteróide. No entanto, o estudo multicêntrico desenvolvido pelo *National Institute of Health* (NIH) que avaliava os possíveis benefícios do corticosteróide na fase tardia da LPA foi interrompido precocemente devido aumento da incidência de neuropatia entre os pacientes que receberam o corticosteróide.

Tem sido demonstrado que a patogênese da LPA / SDRA varia se o insulto ao parênquima pulmonar é direto ou indireto (Gattinoni et al., 1998; Menezes et al., 2005; Santos et al., 2006). No entanto, a maioria dos estudos clínicos na terapêutica da LPA não considera as diferentes etiologias.

O presente trabalho visa testar a hipótese de que o corticosteróide age diferentemente dependendo da etiologia da Lesão Pulmonar Aguda, isto é, se

direta ou indireta. Para tal, utilizou-se um modelo de LPA induzido por LPS de *E. coli* com mesmo grau de lesão funcional (Menezes et al., 2005).

III. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos respiratórios do corticosteróide em modelo experimental de LPA direta e indireta com mesmo grau de lesão funcional.

- ✓ Estudar a mecânica respiratória *in vivo* e *in vitro*;
- ✓ Estudar as alterações morfométricas e a celularidade total e diferencial no parênquima pulmonar;
- ✓ Quantificar o percentual de vasos, vias aéreas e alvéolos nos retalhos subpleurais do parênquima pulmonar;
- ✓ Quantificar o conteúdo de fibras colágenas e elásticas (fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas) na fase precoce da LPA direta e indireta e após o tratamento;
- ✓ Realizar a análise ultraestrutural do parênquima pulmonar;
- ✓ Quantificar a celularidade total e diferencial e os níveis de IL-6, IL-8, e TGF- β no fluido do lavado broncoalveolar (BALF);
- ✓ Correlacionar os achados funcionais com as alterações histopatológicas pulmonares;
- ✓ Correlacionar os parâmetros da mecânica tecidual com o conteúdo de fibras colágenas e elásticas no septo alveolar.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Cento e noventa e quatro camundongos BALB/c, pesando entre 20 e 25 g, foram alocados em quatro experimentos: (1) Medida da mecânica respiratória *in vivo* e *in vitro* e estudo histopatológico (n=36); (2) Análise do fluido do lavado broncoalveolar (BALF) (n=140); (3) Microscopia eletrônica (n=18).

O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Para a análise da mecânica respiratória, trinta e seis camundongos oriundos do biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram anestesiados com sevoflurano e randomicamente alocados em seis grupos, sendo submetidos aos seguintes procedimentos:

- a) **Grupo CT:** Seis animais receberam 0,05 mL de salina (0,9% NaCl) instilada por via intratraqueal (i.t.).
- b) **Grupo CP:** Seis animais receberam 0,5 mL de salina (0,9% NaCl) injetada por via intraperitoneal (i.p.).
- c) **Grupo LT:** Seis animais receberam solução contendo 10 µg de LPS *E. coli* diluídos em 0,05 mL de salina instilada i.t. (LPA i.t.).
- d) **Grupo LP:** Seis animais receberam solução contendo 125 µg de LPS de *E. coli* diluídos em 0,5 mL de salina injetada i.p. (LPA i.p.).

- e) Grupo M-LT:** Seis animais foram tratados com metilprednisolona (M), na dose de 2 mg/kg por via endovenosa, 1 h após a administração da solução contendo 10 µg de LPS de *E. coli* i.t. (LPA i.t. + tratamento).
- f) Grupo M-LP:** Seis animais foram tratados com metilprednisolona, na dose de 2 mg/kg por via endovenosa, 1 h após a administração da solução contendo 125 µg de LPS de *E. coli* i.p. (LPA i.p. + tratamento).

Vinte e quatro horas após a indução da lesão analisou-se a mecânica respiratória *in vivo* e *in vitro*, e a morfometria pulmonar.

O experimento destinado à quantificação de células inflamatórias e dosagem de citocinas no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) foi realizado no Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Farmacodinâmica, FIOCRUZ. Setenta camundongos foram submetidos ao mesmo protocolo de instilação e injeção previamente descrito. Acrescentou-se dois grupos que receberam salina (NaCl 0,9%), respectivamente, por via intratraqueal e intraperitoneal, sendo tratados com metilprednisolona 1 h após. O BALF foi analisado 24 h após a instilação i.t. ou injeção i.p. (n=5 para cada grupo). Dez camundongos foram alocados nos grupos controle, LPA e LPA + tratamento, por via i.t. ou i.p., sendo o BALF coletado 24 e 48 h após a indução da lesão (n=5 para cada grupo, totalizando 12 grupos, sendo 6 grupos analisados após 24 h e o restante, após 48 h). Este experimento foi repetido integralmente para que os resultados fossem confirmados, totalizando 140 camundongos utilizados para este experimento.

Paralelamente, 18 camundongos foram alocados nos grupos descritos acima (n=3 para cada grupo) para análise ultraestrutural. Esta fase do projeto foi

desenvolvida em colaboração com o Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

IV.2. MECÂNICA RESPIRATÓRIA *IN VIVO*

Após 24 h da indução da lesão pulmonar, os animais foram sedados com diazepam (1 mg i.p.), anestesiados com pentobarbital sódico (20 mg/kg i.p.), e uma cânula (jelco n° 20) foi introduzida na traquéia. A parede torácica anterior foi cirurgicamente removida e uma PEEP de 2 cmH₂O foi aplicada imediatamente antes da abertura da cavidade pleural. Os animais tiveram sua musculatura paralisada após a administração de trietiliodeto de galamina (2 mg/kg i.v.) e a ventilação artificial foi instituída por um ventilador de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai) com frequência de 100 incursões respiratórias por minuto e um volume corrente (V_T) de 0,2 mL. O ventilador foi ajustado previamente para gerar uma pausa ao final da inspiração de 5 segundos. Foram tomados cuidados especiais na manutenção do volume ($V_T = 0,2$ mL) e fluxo ($V' = 1$ mL/s) constantes em todos os animais a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas (Figura 1).

Um pneumotacógrafo (1,5 mm ID, comprimento = 4,2 cm, distância entre os orifícios = 2,1 cm) construído de acordo com Mortola e Noworaj (1983) foi conectado na cânula traqueal para medida do fluxo aéreo (V') e modificações do volume corrente (V_T). O gradiente de pressão através do pneumotacógrafo foi determinado por um transdutor diferencial de pressão Validyne MP45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA). A resistência ao fluxo do equipamento

(Req), incluindo a cânula traqueal, foi constante até fluxos de 26 mL/s, medindo 0,12 cmH₂O. A pressão resistiva do equipamento (= Req.V') foi subtraída do sistema respiratório e das pressões viscosas pulmonares de maneira que os resultados apresentados representem valores intrínsecos. Uma vez que modificações abruptas no diâmetro não estiveram presentes no nosso circuito, erros de medida da resistência ao fluxo foram provavelmente evitados (Chang et al., 1981). A pressão traqueal (Ptr) foi medida com um transdutor diferencial de pressão Validyne MP45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA). Todos os sinais foram condicionados e amplificados num polígrafo Beckman tipo R (Schiller Park, IL, EUA). Sinais de pressão e fluxo passaram através de filtros Bessel de 8 pólos (902LPF, Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA), foram convertidos de analógico para digital e armazenados num computador. Todos os dados foram coletados usando o software LABDAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, Quebec, Canadá) (Figura 1).

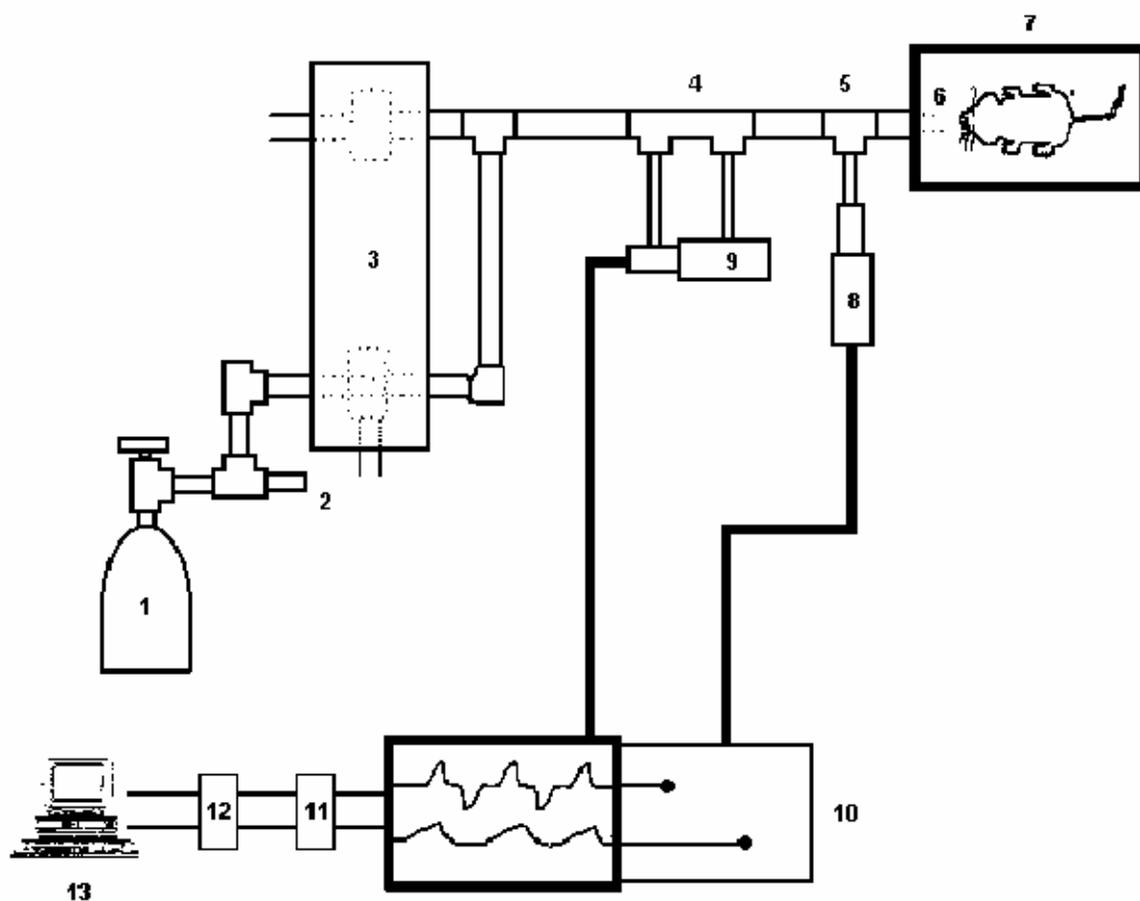


Figura 1 – Montagem experimental consistindo de:

- 1- Cilindro de ar comprimido.
- 2- Rotâmetro de agulha.
- 3- Ventilador de fluxo inspiratório constante composto por duas válvulas solenóides.
- 4- Pneumotacógrafo.
- 5- Peça T para medição de pressão nas vias aéreas.
- 6- Cânula traqueal.
- 7- Mesa cirúrgica.
- 8- Transdutor de pressão traqueal.
- 9- Transdutor diferencial de pressão para medição de fluxo.
- 10- Polígrafo de oito canais com amplificação dos sinais de V' e P_{tr} .
- 11- Filtros.
- 12- Conversor analógico-digital de 12 bits.
- 13- Microcomputador.

IV.2.A. Método de Oclusão ao Final da Inspiração

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração (Bates et al., 1985), que permite analisar separadamente os componentes elástico, viscoso e viscoelástico e/ou inomogêneo do sistema respiratório.

No animal com o tórax aberto, a P_{tr} é, na realidade, a pressão transpulmonar (P_L). Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da P_L até um ponto de inflexão ($P_{i,L}$) a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão ($P_{el,L}$). A diferença de pressão ($\Delta P_{1,L}$) que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ($P_{max,L}$) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ($P_{i,L}$), corresponde ao componente viscoso pulmonar. A segunda variação de pressão ($\Delta P_{2,L}$), representada pela queda lenta, do P_i ao platô ($P_{el,L}$), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico e/ou inomogêneo. A soma de $\Delta P_{1,L}$ e $\Delta P_{2,L}$ fornece a variação total de pressão no pulmão ($\Delta P_{tot,L}$) (Figura 2).

As elastâncias estática ($E_{st,L}$) e dinâmica ($E_{dyn,L}$) do pulmão podem, então, ser obtidas dividindo-se $P_{el,L}$ e $P_{i,L}$, respectivamente, pelo volume corrente. ΔE_{L} é a diferença entre $E_{dyn,L}$ e $E_{st,L}$.

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o volume nunca cai a zero imediatamente após a oclusão,

propiciando, assim, a existência de um pequeno fluxo. Este fluxo será responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, de $P_{i,L}$ e $P_{e,L}$ (Bates et al., 1987; Kochi et al., 1988). Por isso, foi feita correção de acordo com Kochi et al. (Kochi et al., 1988).

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$\Delta P_{1,L} = P_{max,L} - P_{i,L}$$

$$\Delta P_{2,L} = P_{i,L} - P_{e,L}$$

$$\Delta P_{tot,L} = \Delta P_{1,L} + \Delta P_{2,L}$$

$$E_{st,L} = P_{e,L} / V_T$$

$$E_{dyn,L} = P_{i,L} / V_T$$

$$\Delta E_{,L} = E_{dyn,L} - E_{st,L}$$

A resistência total do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida através da aplicação de fluxos de ar ao sistema com concomitante registro das variações de pressão (ΔP). Uma vez que $R = \Delta P / V'$, a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A R_{eq} , constante até fluxos de 26 mL/s, foi de 0,12 cmH₂O/mL.s. A variação de pressão determinada pelo equipamento ($\Delta P_{eq} = R_{eq} \cdot V'$) foi subtraída de $\Delta P_{1,L}$ de forma que os resultados refletem propriedades mecânicas intrínsecas (Figura 2).

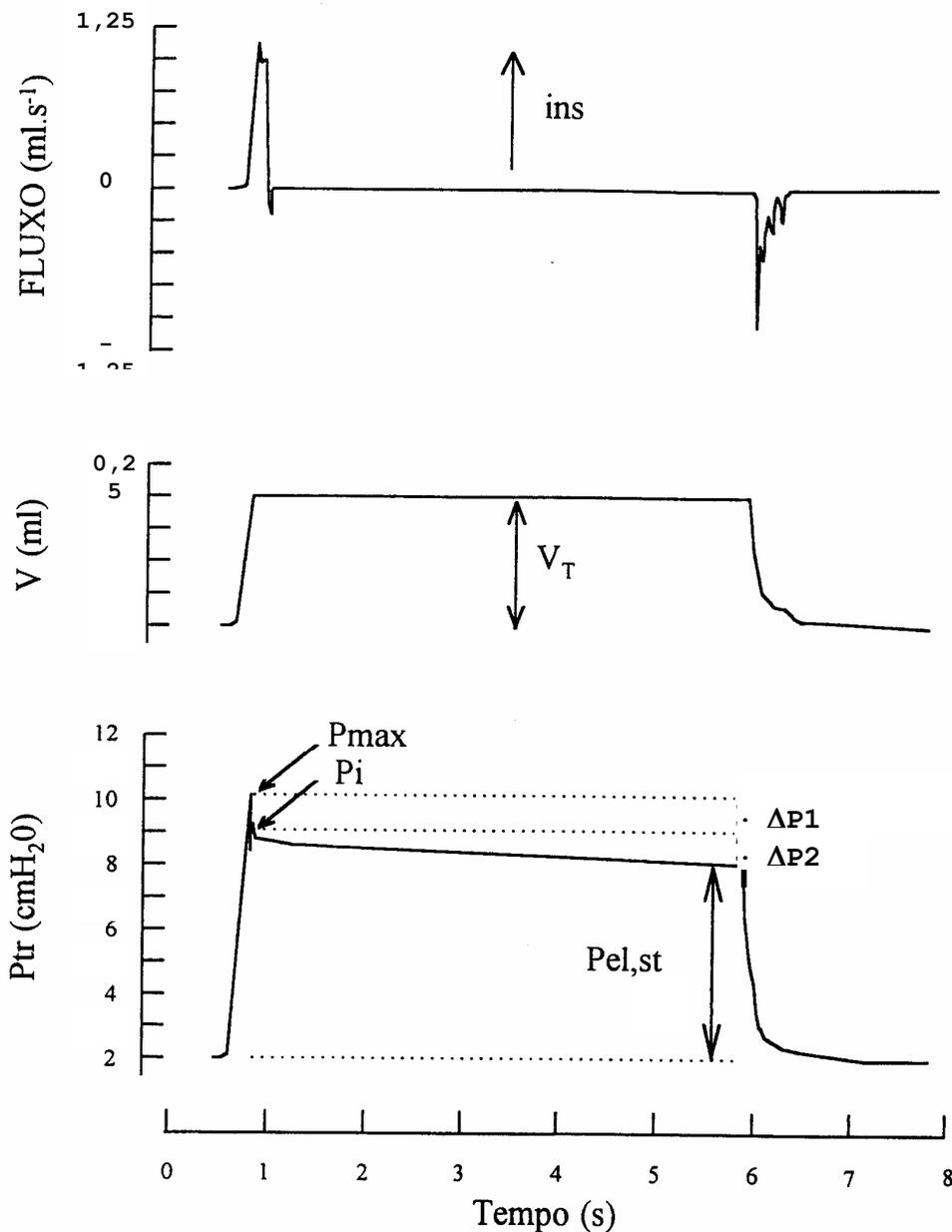


Figura 2 – Método de Oclusão ao Final da Inspiração. Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume (V_T) e pressão traqueal (P_{tr}) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com $V_T = 0,2$ mL e fluxo aéreo de 1 mL/s constantes. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na P_{tr} ($\Delta P1$) que corresponde a $P_{max} - P_i$, pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ($\Delta P2$), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representada pela pressão de retração elástica pulmonar (P_{el}). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da inspiração (PEEP) de 2 cmH₂O.

IV.3. REMOÇÃO DOS PULMÕES

Imediatamente após a medida da mecânica respiratória, os animais receberam heparina 1000 UI por via intravenosa. A traquéia foi ocluída ao final da expiração com um fio de algodão e a aorta abdominal e veia cava inferior foram seccionadas, levando a uma hemorragia maciça que matava o animal. A porção abdominal do esôfago foi identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço foram dissecadas com liberação das vias aéreas. A pinça que prendia o esôfago era suavemente tracionada para cima, permitindo separá-lo das estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traquéia foi seccionada acima do local ligado pelo fio e, posteriormente, o esôfago foi separado do conjunto por leve tração. Os pulmões foram removidos *en bloc*.

O pulmão direito foi congelado por imersão rápida em nitrogênio líquido para análise histológica, e o pulmão esquerdo único foi imerso em solução de Krebs-Henseleith modificada (K-H), contendo (mM) 118,4 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 K₃PO₄, 25 NaHCO₃, 2,5 CaCl₂.H₂O, 0,6 MgSO₄.H₂O, e 11,1 de glicose (Sigma Chemical, St, Louis, MO, EUA), pH = 7,40 e 6°C.

IV.4. MECÂNICA RESPIRATÓRIA *IN VITRO*

Um retalho subpleural do parênquima (2x2x10 mm) foi retirado da periferia de cada pulmão esquerdo. Os retalhos foram pesados (W), e seu comprimento basal (L_0) foi determinado com um paquímetro. O volume dos retalhos pulmonares foi calculado por densitometria simples, como: $Vol = \Delta F / \delta$, onde ΔF é a variação total na força antes e após a imersão do retalho em solução K-H e δ é

a densidade de massa da solução K-H ($1,002 \text{ g/cm}^3$) (Scherle, 1970). Os retalhos foram colocados num banho recirculante de solução K-H gelada, continuamente borbuhlada com uma mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2 (Salerno et al., 1998; Lopez-Aguilar et al., 1998; Rocco et al., 2001, 2003; Leite-Júnior et al., 2003).

IV.4.A. Aparato experimental

Os retalhos de parênquima foram suspensos verticalmente num recipiente contendo solução K-H, mantida a 37°C e continuamente borbuhlada com 95% de O_2 e 5% de CO_2 (Romero et al., 2001; Faffe et al., 2001; Rocco et al., 2001, 2003; Leite-Júnior, et al., 2003). Clips de metal foram fixados nas extremidades do retalho com cianocrilato. Uma das extremidades foi conectada a um transdutor de força (FT03, Grass Instruments Co., Quincy, MA, EUA), enquanto a outra foi atada a uma haste vertical. Esta haste foi conectada a um autofalante, que amplificava o sinal sinusoidal oriundo de um gerador de função (3312A Function Generator, Hewlett Packard, Beaverton, OR, EUA). Esta haste era conectada a um segundo transdutor de força (FT03, Grass Instruments Co., Quincy, MA, EUA) por uma mola de prata com módulo de Young conhecido, o que permitia a medida do deslocamento. Sinais de força e deslocamento foram condicionados, passaram através de filtros Bessel de 8 pólos (902LPF, Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA), convertidos de analógico para digital e armazenados num computador (Figura 3).

A resposta de frequência do sistema foi dinamicamente estudada usando-se molas de prata calibradas com diferentes módulos elásticos de Young. Nenhuma dependência de amplitude ou diferença de fase com a frequência

foram detectadas entre 0,01 e 14 Hz. A histeresividade do sistema foi independente da frequência e possuiu um valor $< 0,003$.

IV.4.B. Precondicionamento

A área de seção transversa (A_0) dos retalhos foi determinada pelo volume e comprimento basal, de acordo com $A_0 = \text{Vol}/L_0$ (Moreto et al., 1994; Yuan et al., 2000). A força basal (F_B) para uma tensão de 10 g/cm^2 foi calculada como $F_B(\text{g}) = 10 (\text{g/cm}^2) \cdot A_0(\text{cm}^2)$, e ajustada pelo deslocamento vertical do transdutor de força (Yuan et al., 2000). O sinal de deslocamento foi mantido em zero. Após o ajustamento dos sinais de força e deslocamento, o comprimento da amostra (L_B) foi medido usando-se um paquímetro. O comprimento instantâneo (L_i) durante a oscilação em torno de L_B foi determinado por adição do valor de L_B e o valor do deslocamento em qualquer tempo.

O condicionamento foi realizado submetendo cada retalho a oscilação sinusoidal por 30 minutos (frequência = 1 Hz; amplitude grande o bastante para alcançar uma tensão máxima de 20 g/cm^2). Logo após, a amplitude foi ajustada para 5% L_0 e a oscilação mantida por mais 30 minutos ou até que uma curva força-deslocamento estivesse estável. A força basal final foi aproximadamente 0,5 g. A solução K-H no banho foi renovada regularmente a cada 20 minutos (Figura 3).

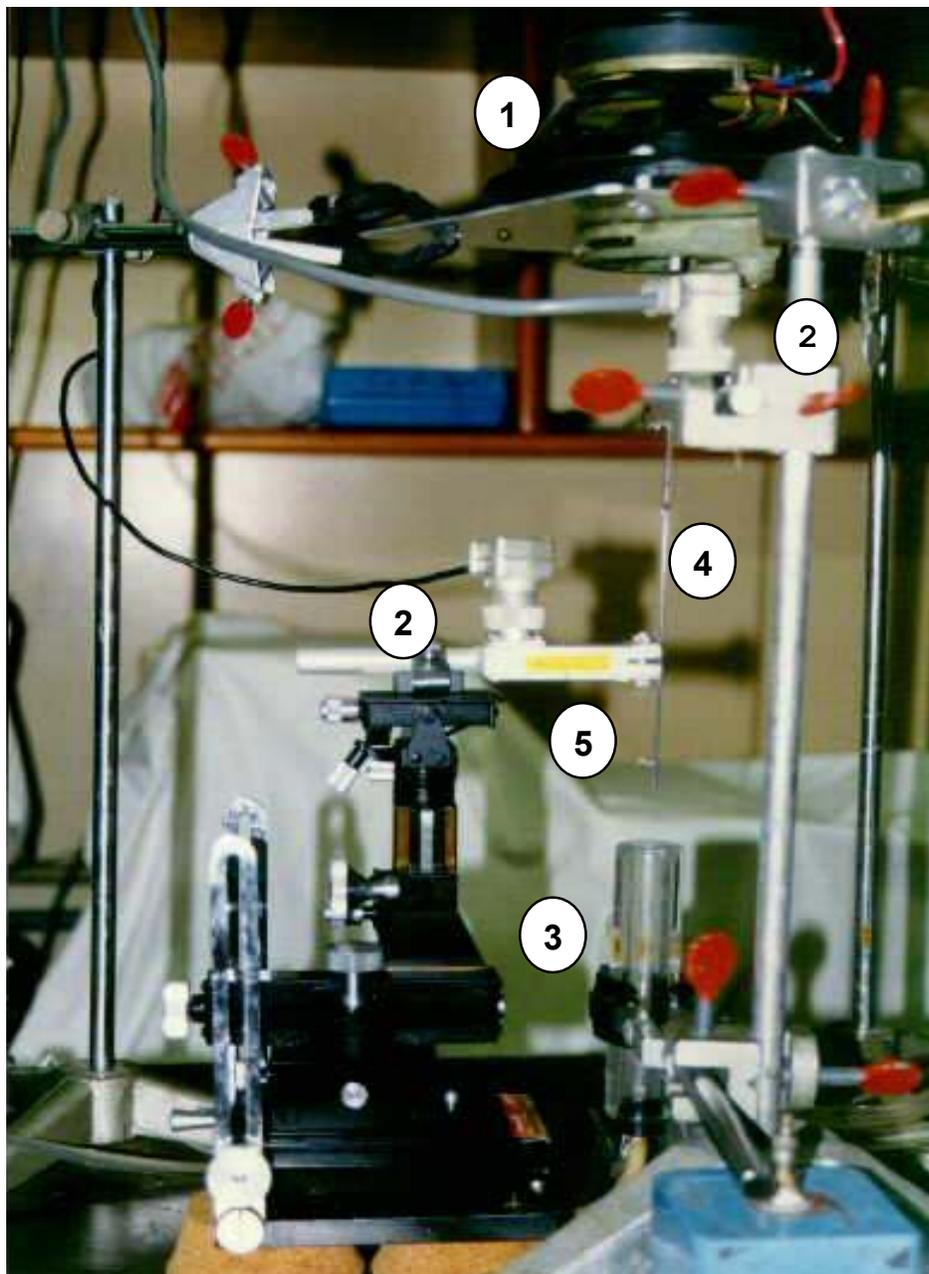


Figura 3 – Montagem experimental para medida da mecânica tecidual.

- 1- Auto-falante.
- 2- Transdutores de força.
- 3- Recipiente onde os retalhos de parênquima pulmonar são continuamente banhados por solução de K-H modificada.
- 4- Haste de fibra de vidro, presa ao transdutor superior por uma mola, para medida do deslocamento.
- 5- Local onde o tecido pulmonar é acoplado.

IV.4.C. Medida da Mecânica Tecidual

Os retalhos de parênquima foram oscilados numa amplitude de 5% de L_0 , na frequência de 1 Hz imediatamente após o condicionamento. Para calcular a resistência tecidual (R), elastância tecidual (E) e histeresividade (η), as curvas de força-deslocamento foram analisadas (Lopez-Aguilar et al., 1998; Rocco et al., 2001, 2003; Leite-Júnior, et al., 2003).

A média instantânea da área de secção transversa (A_i) foi determinada como: $A_i = Vol/L_i$ (cm^2), onde L_i é o comprimento instantâneo. A tensão instantânea (σ_i) foi calculada dividindo força (g) por A_i .

Todos os parâmetros foram medidos ciclo por ciclo. A resistência tecidual (R) foi determinada a partir da área contida na curva força-deslocamento:

$$R = (4.H) / [\pi.\omega.(\Delta\varepsilon)^2]$$

onde H é a área de histerese da curva tensão-deslocamento, ω é a frequência angular ($\omega = 2\pi f$, rad/s), e $\Delta\varepsilon$ é o deslocamento normalizado ou variação de deslocamento ciclo por ciclo dividido por L_B . A elastância dinâmica tecidual foi determinada por:

$$E = (\Delta\sigma_i / \Delta\varepsilon) \cos\theta$$

onde $\Delta\sigma_i$ representa a variação ciclo por ciclo na força, e θ é o ângulo de fase entre força e deslocamento [$\theta = \sin^{-1} (4H / \pi.\Delta\sigma_i.\Delta\varepsilon)$]. A histeresividade, uma variável empiricamente determinada que quantifica a dependência de processos dissipativos nos processos elásticos (Fredberg et al., 1989), foi determinada como $\eta = \tan\theta$.

IV.5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os pulmões direitos e os retalhos do parênquima pulmonar foram congelados através de imersão, por aproximadamente 3 minutos, em nitrogênio líquido, retirados e mantidos em solução Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%, por volume) a -70°C por 24 h. Após este período, o material foi desidratado progressivamente através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol, como discriminado abaixo:

- MC-1: Etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a -20°C durante 1h;
- MC-2: Etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a -20°C durante 1h;
- MC-3: Etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a -20°C durante 1h
- Etanol 100%, sendo mantidos a -20°C por 1 h.

Posteriormente, os pulmões e retalhos do parênquima pulmonar foram mantidos a -4°C por 24 h. Após a fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com $3\ \mu\text{m}$ de espessura.

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas por microscopia óptica (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas, em aumento de 100 e 400x.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) (Weibel et al., 1990), utilizando uma ocular acoplada ao microscópio contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostos em paralelo (Figura 4).

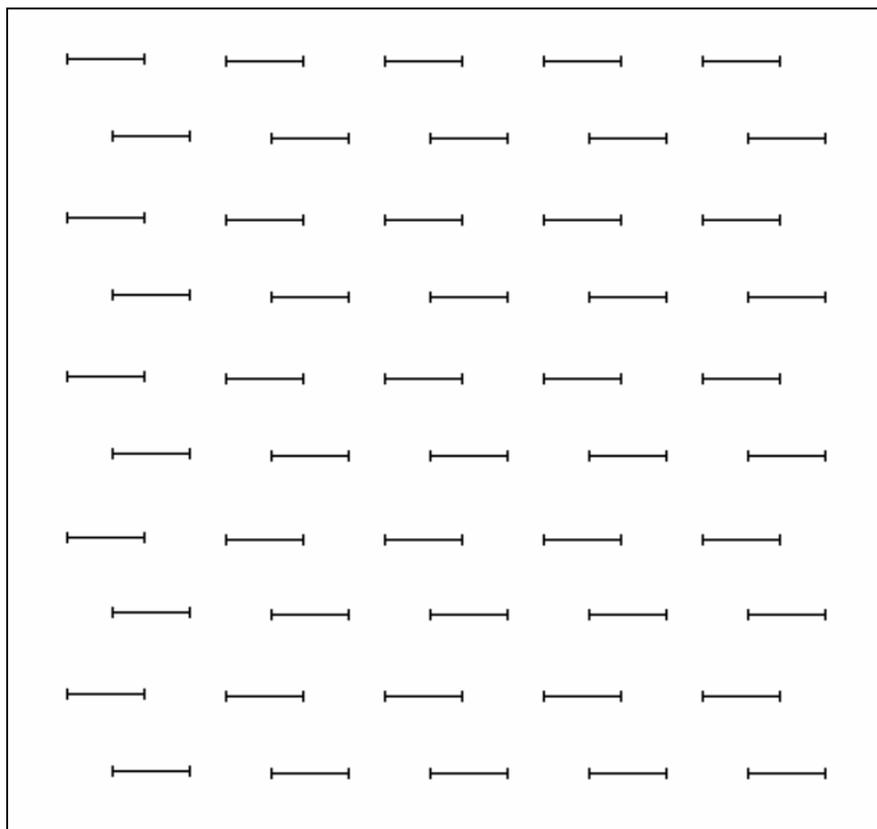


Figura 4 – Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.

Em um aumento de 200x foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. Foi quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados. A celularidade total e diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) no parênquima pulmonar foi quantificada num aumento de 1000x. Nos retalhos de parênquima pulmonar foram quantificados, pela mesma técnica descrita anteriormente e em aumento de 200x, os percentuais de septo alveolar, vias aéreas e vasos.

As lâminas também foram coradas com métodos específicos para quantificação de fibras colágenas elásticas no septo alveolar. *Colágeno*: Os tecidos foram corados numa solução de Sirius Red dissolvido em solução saturada de ácido pícrico e observados sob microscopia de luz polarizada, uma vez que a acentuação da birrefringência do colágeno promovida pelo método de polarização de picrosirius é específica para estruturas colágenas (Montes, 1996). *Fibras elásticas*: Dois diferentes métodos foram utilizados: método de resorcina-fucsina de Weigert (RF) (Weigert, 1898), que permite a identificação de fibras elásticas e fibras elásticas maduras, e o método de resorcina-fucsina de Weigert modificado com oxidação (ORF) (Fullmer et al., 1974), que permite a identificação dos três componentes do sistema de fibras elásticas (oxitalânicas, elásticas e elásticas maduras). As fibras oxitalânicas foram calculadas subtraindo a quantidade de fibras dadas pelo método RF dos valores encontrados pelo método ORF.

IV.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para a análise da microscopia eletrônica foram retirados dois fragmentos de parênquima pulmonar (0,2x0,2x0,2 cm). Os fragmentos foram colocados em glutaraldeído com tampão fosfato preparado a 2%, por 2 h, sendo posteriormente colocados em sacarose. Os espécimes permaneciam em solução de sacarose até o processamento, constituída de 4,5 g de NaCl e 8,9 g de sacarose diluídos em 500 mL de água destilada. A seguir os fragmentos foram imersos em solução de tetróxido de ósmio (0,405 a 1% de água, contendo 106 ou 133 mg de sacarose por mL) por 2 h. Após a lavagem em água bidestilada as preparações foram colocadas na geladeira em solução aquosa 0,5% de acetato de uranila contendo 106 a 133 mg de sacarose, por um tempo médio que variou de 2 a 24 h. O processo foi continuado, efetuando-se a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, progredindo gradativamente até álcool absoluto, sendo então passado em óxido de propileno por 15 minutos (2 vezes). Iniciando a fase de embebição, as amostras foram colocadas em misturas de partes iguais de óxido de propileno e resina. Os frascos contendo os fragmentos foram colocados para girar (1 rotação a cada 4 minutos, por 1 hora). Posteriormente, as peças foram colocadas por 16 h em resina, com a seguinte composição: 10 mL de araldite (Cy-205), 8 mL de endurecedor DDSA (anidrido de ácido doxecenil succínico), 0,5 mL de acelerador (N-benzil dimetilamina) e 0,1 mL de plastificante (dibutilftaltato).

Ao término de 16 h, as amostras foram colocadas em moldes de silicone com nova resina, para polimerização em estufa a 60°C, por 5 dias.

Concluída a polimerização, os espécimes foram aparados e cortes semifinos foram obtidos com o ultra-micrótomo Porter Blum MT2. Tais cortes, com 0,5 μm de espessura foram montados em lâminas de vidro e corados com uma mistura de azul de metileno a 1% e azur II, em partes iguais e a quente. Nestes cortes, selecionou-se áreas representativas das lesões. De cada espécime, 2 blocos contendo aproximadamente 10 fragmentos cada um, foram submetidos à análise para seleção dos cortes ultrafinos.

Para o estudo ultraestrutural, os cortes ultrafinos com espessura em torno de 90 milimicrômetros foram contrastados pelo acetato de uranila a 2% durante 30 minutos e, finalmente, por citrato de chumbo por 10 minutos. A observação dos cortes e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico JEOL.

IV.7. ANÁLISE DO LAVADO BRONCOALVEOLAR

IV.7.A. Análise leucocitária

Os camundongos destinados a este experimento foram sacrificados numa câmara de CO_2 . Posteriormente, foram exsangüinados conforme descrito anteriormente, traqueotomizados, e uma cânula acoplada a agulha de uma seringa de 1 mL foi introduzida na traquéia dos animais. A seringa estava cheia com solução salina estéril (0,9% NaCl) e o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) foi retirado pela administração via cânula traqueal de 0,5 mL de salina, por 8 vezes. A manobra era considerada satisfatória quando fosse possível resgatar cerca de 70% do volume administrado. Após a centrifugação de 100 μL do lavado broncoalveolar, a contagem de leucócitos totais foi realizada em câmaras de

Neubauer sob microscopia óptica após diluição das amostras em solução de Türk (2% de ácido acético). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço corado pelo método de May-Grünwald-Giemsa.

IV.7.B. Dosagem de citocinas

O restante do volume coletado foi utilizado para detecção e quantificação de IL-6, KC (IL-8) e TGF- β (Pharmingem). As dosagens foram obtidas por ensaio ELISA-sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante, com pares de anticorpos monoclonais (captura e detecção), utilizando-se strepto-avidina conjugado à fosfatase alcalina e paranitrofenol fosfato como substrato. As leituras foram realizadas com filtros de 405 nm. Citocinas recombinantes foram utilizadas para obtenção de curvas-padrão.

IV.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros mecânicos, histopatológicos e do BALF dos grupos C, L e M-L nas lesões direta ou indireta foram comparados pela análise de variância considerando-se 2 fatores: etiologia da lesão e uso ou não de esteróide (Two-way ANOVA).

Para a comparação entre os grupos utilizou-se One-way ANOVA.

Caso múltiplas comparações fossem necessárias, o teste de Tukey era aplicado.

A relação entre parâmetros mecânicos e morfométricos foram avaliados pela correlação de Spearman. Em todos os testes, o nível de significância foi 5%.

A análise estatística foi realizada com SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA).

V. RESULTADOS

O volume, o fluxo e o tempo inspiratório (Ti) foram similares nos 6 grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Fluxo, volume (V_T) e tempo inspiratório (Ti)

| GRUPOS | FLUXO mL/s | V_T mL | Ti |
|-------------|--------------------|-------------|-------------|
| CP | 1,00 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 |
| LP | 1,01 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 |
| M-LP | 1,00 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 |
| CT | 1,04 ± 0,01 | 0,21 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 |
| LT | 1,01 ± 0,02 | 0,21 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 |
| M-LT | 1,01 ± 0,02 | 0,20 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 |

Os valores correspondem à média ± EPM de 8 a 10 aferições por cada camundongo 24 h após a administração de salina (C) ou LPS de *E. coli* (L). Metilprednisolona (2 mg/kg i.v.) foi administrada 1 h após a indução da lesão (M). P: Injeção intraperitoneal; T: Instilação intratraqueal.

A administração de LPS tanto por via intratraqueal como por via intraperitoneal acarretou aumento similar nos valores de $\Delta P1$, $\Delta P2$, ΔP_{tot} , ΔE , Est e Edyn (Figuras 5 e 6). No entanto, o corticóide foi capaz de modificar a mecânica somente na LPA por via direta, sendo os valores da mecânica *in vivo* similares no grupo M-LT e CT. O uso do corticosteróide não atenuou as alterações da mecânica *in vivo* quando LPS *E. coli* foi injetado intraperitonealmente (Figuras 5 e 6).

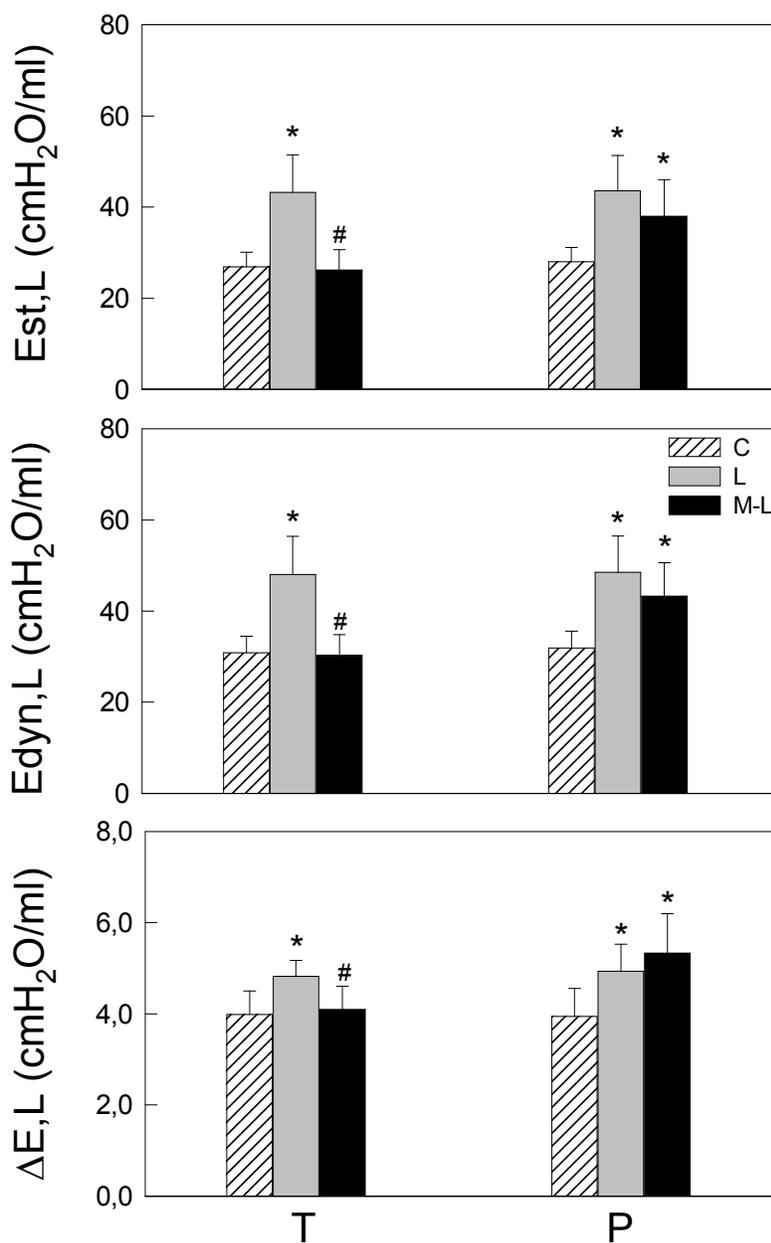


Figura 5 – Elastâncias estática (Est), dinâmica (Edyn) e variação de elastância (ΔE) nos grupos controle (C), submetido a LPA (L) e tratado com metilprednisolona (2 mg/kg i.v.) 1 h após a indução da lesão (M-L). T: instilação intratraqueal; P: injeção intraperitoneal. Valores correspondem a média \pm EPM de 6 animais (8-10 determinações/animal). *Significativamente diferente de C; # Significativamente diferente de L ($p < 0,05$).

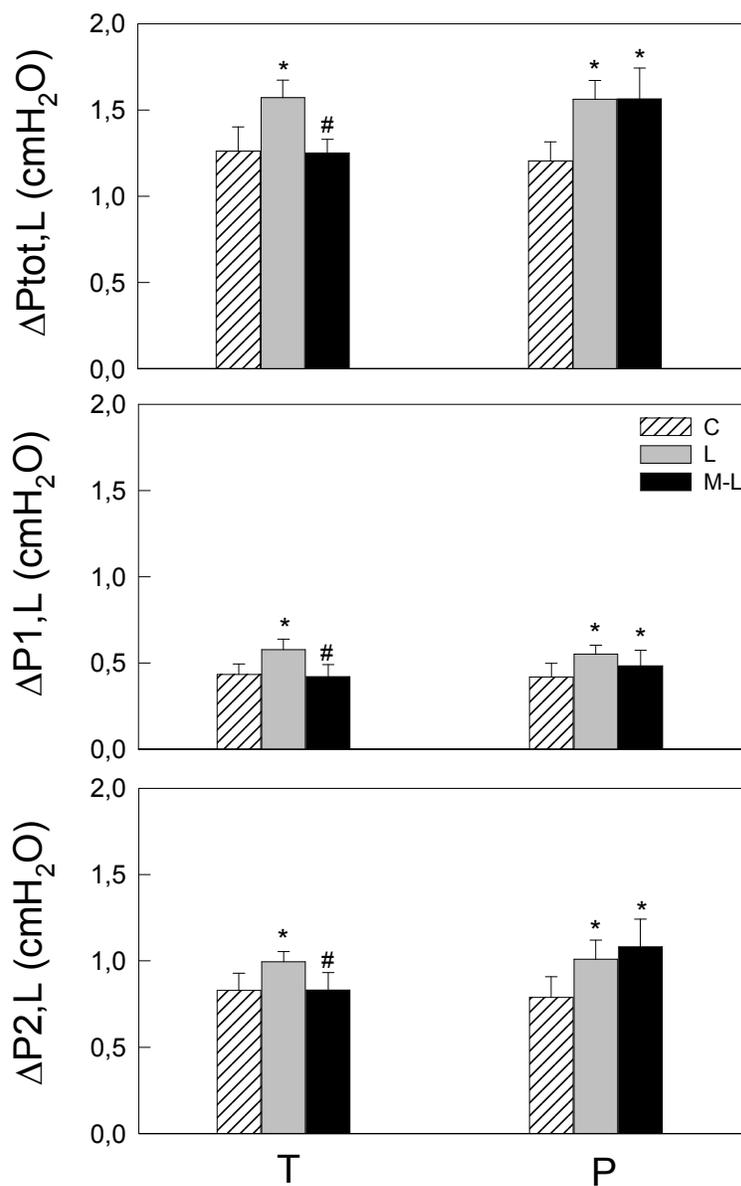


Figura 6 – Variação das pressões viscosa (ΔP_1), viscoelástica (ΔP_2) e total (ΔP_{tot}) nos grupos controle (C), submetido a LPA (L) e tratado com metilprednisolona (2 mg/kg i.v.) 1 h após a indução da lesão (M-L). T: instilação intratraqueal; P: injeção intraperitoneal. Valores correspondem a média \pm EPM de 6 animais (8-10 determinações/animal). *Significativamente diferente de C; # Significativamente diferente de L ($p < 0,05$).

Os valores de E, R e η na frequência de 1 Hz são mostrados na tabela 2. E, R e η se elevaram similarmente nos grupos LT e LP. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT e CP, e M-LT e M-LP. O uso do corticosteróide atenuou os valores de E, R e η independentemente da etiologia da lesão pulmonar.

Tabela 2. Elastância (E), resistência (R) e histeresividade (η) do tecido pulmonar.

| GRUPOS | E (N/m².10⁴) | R (N.s/m².10²) | η |
|---------------|---|---|--------------------------|
| CP | 1,01 ± 0,06 | 0,92 ± 0,06 | 0,064 ± 0,002 |
| LP | 1,48 ± 0,07 * | 1,48 ± 0,08 * | 0,076 ± 0,001* |
| M-LP | 1,13 ± 0,11 | 1,12 ± 0,11 | 0,074 ± 0,002* |
| CT | 1,00 ± 0,08 | 0,93 ± 0,06 | 0,064 ± 0,001 |
| LT | 1,51 ± 0,04 ** | 1,46 ± 0,06 ** | 0,077 ± 0,003** |
| M-LT | 1,17 ± 0,08 | 1,14 ± 0,06 | 0,075 ± 0,003** |

Os valores correspondem a média ± erro padrão da média (EPM) de 6 animais em cada grupo, 24 h após ser administrado salina (C) ou LPS de *E. coli* (L). Metilprednisolona (2 mg/kg i.v.) foi administrada 1 h após a indução da lesão (M). P: injeção intraperitoneal; T: instilação intratraqueal. * Significativamente diferente de CP; ** Significativamente diferente de CT (p < 0,05).

As médias (\pm EPM) da porcentagem das áreas normais, colapsadas e hiperinsufladas são mostradas na Tabela 3. A fração de área de colapso alveolar aumentou de CT e CP para LT e LP, respectivamente. O uso do corticosteróide reduziu o colapso alveolar preferencialmente em M-LT do que M-LP. Este fato pode ser observado também na Figura 7, a partir da análise qualitativa do parênquima pulmonar. Nota-se aumento da celularidade e edema intersticial após a indução da lesão pulmonar.

Tabela 3. Morfometria pulmonar

| GRUPOS | Áreas Normais (%) | Colapso Alveolar (%) | Hiperinsuflação Alveolar (%) |
|---------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| CP | 92,11 \pm 0,27 | 7,18 \pm 0,52 | 0,70 \pm 0,52 |
| LP | 77,69 \pm 1,50 * | 22,19 \pm 1,32 * | 0,12 \pm 0,26 |
| M-LP | 84,71 \pm 2,18 *# | 14,50 \pm 2,23 *# | 0,79 \pm 0,77 |
| CT | 90,97 \pm 2,74 | 8,95 \pm 2,65 | 0,09 \pm 0,19 |
| LT | 77,64 \pm 4,05 * | 22,36 \pm 4,05 * | 0,00 \pm 0,00 |
| M-LT | 88,20 \pm 1,14 # | 11,42 \pm 1,02 # ** | 0,38 \pm 0,39 |

Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. Foram estudados 10 campos por lâmina para cada camundongo 24 h após ser administrado salina (C) ou LPS de *E. coli* (L). Metilprednisolona (2 mg/kg i.v.) foi administrada 1 h após a indução da lesão (M). P: injeção intraperitoneal; T: instilação intratraqueal. *Significativamente diferente de C; # Significativamente diferente de L; ** Significativamente diferente do grupo M-LP ($p < 0,05$).

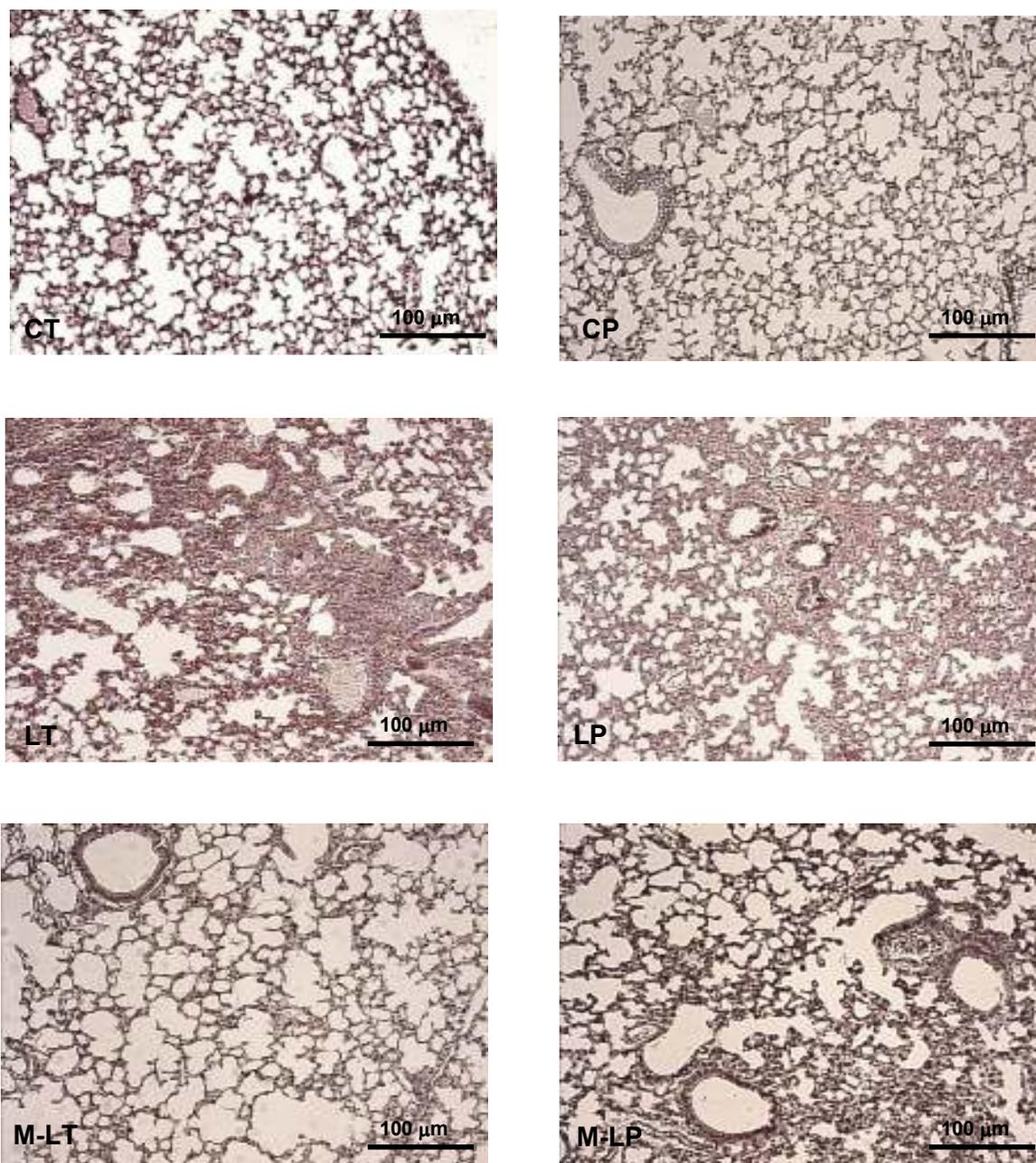


Figura 7 – Fotomicrografia de parênquima pulmonar corado em H&E de animais que receberam salina por via i.p. (CP) e i.t. (CT), LPS i.p. (LP) e i.t. (LT), e após tratamento com Metilprednisolona (M-LP e M-LT).

O percentual de celularidade total e diferencial por unidade de septo do parênquima pulmonar é demonstrado na Figura 8. A celularidade total e a quantidade de células polimorfonucleares no parênquima pulmonar aumentaram similarmente de CT e CP para LT e LP, respectivamente, e diminuíram nos grupos M-LT e M-LP. No entanto, a redução da celularidade foi mais intensa no grupo M-LT quando comparado com M-LP. A quantificação das células mononucleares foi similar em todos os grupos.

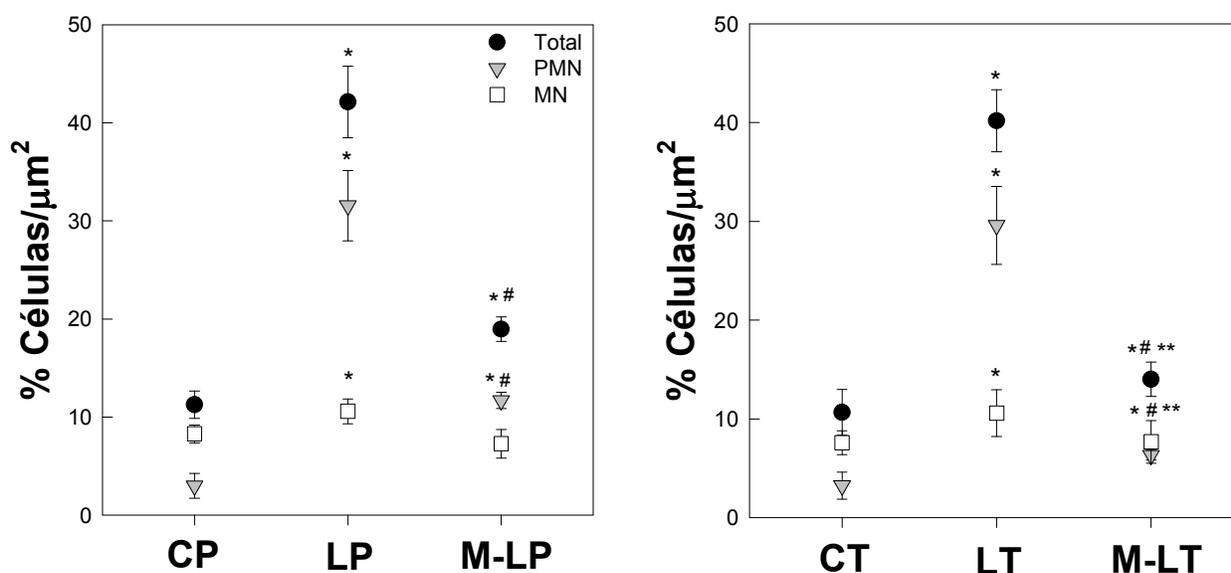


Figura 8 – Percentual de celularidade total e diferencial por unidade de septo no parênquima pulmonar (aumento de 1000x). Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. C: Controle; L: LPS *E. coli*; M-L: Metilprednisolona (2 mg/kg i.v.) 1 h após a indução da lesão pulmonar. P: injeção intraperitoneal; T: instilação intratraqueal. PMN: Células polimorfonucleares; MN: Células mononucleares. *Significativamente diferente de C; # Significativamente diferente de L; ** Significativamente diferente de M-LP ($p < 0,05$).

Os valores da celularidade no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) são mostrados na Tabela 4. Observa-se aumento da celularidade total às custas de neutrófilos apenas na lesão pulmonar aguda direta (LT), que foi atenuado com o uso do corticosteróide (M-LT).

Tabela 4. Celularidade total e diferencial no fluido do lavado broncoalveolar

| GRUPOS | Celularidade Total (n° células x 10⁵/mL) | Macrófagos (%) | Neutrófilos (%) | Eosinófilos (%) |
|---------------|--|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| CP | 1,68 ± 0,55 | 98,6 ± 1,5 | 0,4 ± 0,5 | 0,0 ± 0,0 |
| LP | 1,37 ± 0,34 | 99,5 ± 0,5 | 0,5 ± 0,5 | 0,0 ± 0,0 |
| M-LP | 0,96 ± 0,16 | 98,6 ± 1,7 | 1,4 ± 1,74 | 0,0 ± 0,0 |
| CT | 1,70 ± 0,40 | 97,0 ± 2,8 | 2,8 ± 2,5 | 0,2 ± 0,4 |
| LT | 11,92 ± 4,70* | 17,0 ± 6,7* | 83,0 ± 6,7* | 0,0 ± 0,0 |
| M-LT | 3,14 ± 1,46*# | 63,2 ± 27,4*# | 36,6 ± 27,6*# | 0,2 ± 0,4 |

Os valores correspondem à média ± erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. Realizou-se análise de 10 campos por lâmina para cada camundongo 24 h após ser administrado salina (C) ou LPS de *E. coli* (L). Metilprednisolona (2 mg/kg i.v.) foi administrada 1 h após a indução da lesão (M). P: injeção intraperitoneal; T: instilação intratraqueal. *Significativamente diferente de CT; # Significativamente diferente de LT ($p < 0,05$).

Como o grau de lesão pulmonar é similar com a indução da lesão direta ou indireta, a celularidade e a dosagem de citocinas no BALF poderiam sofrer alterações unicamente devido a um componente temporal. Logo, IL-6, KC e TGF- β foram dosados no BALF 24 e 48 horas após a indução da lesão, e os resultados são mostrados nas Figuras 9 a 11.

IL-6 e KC aumentaram de forma mais significativa no grupo LT do que em LP, e o corticosteróide foi capaz de reduzir seus valores apenas no grupo M-LT. Os valores de TGF- β aumentaram tardiamente apenas no grupo de lesão pulmonar por via direta, não sendo modificado com o uso do corticosteróide.

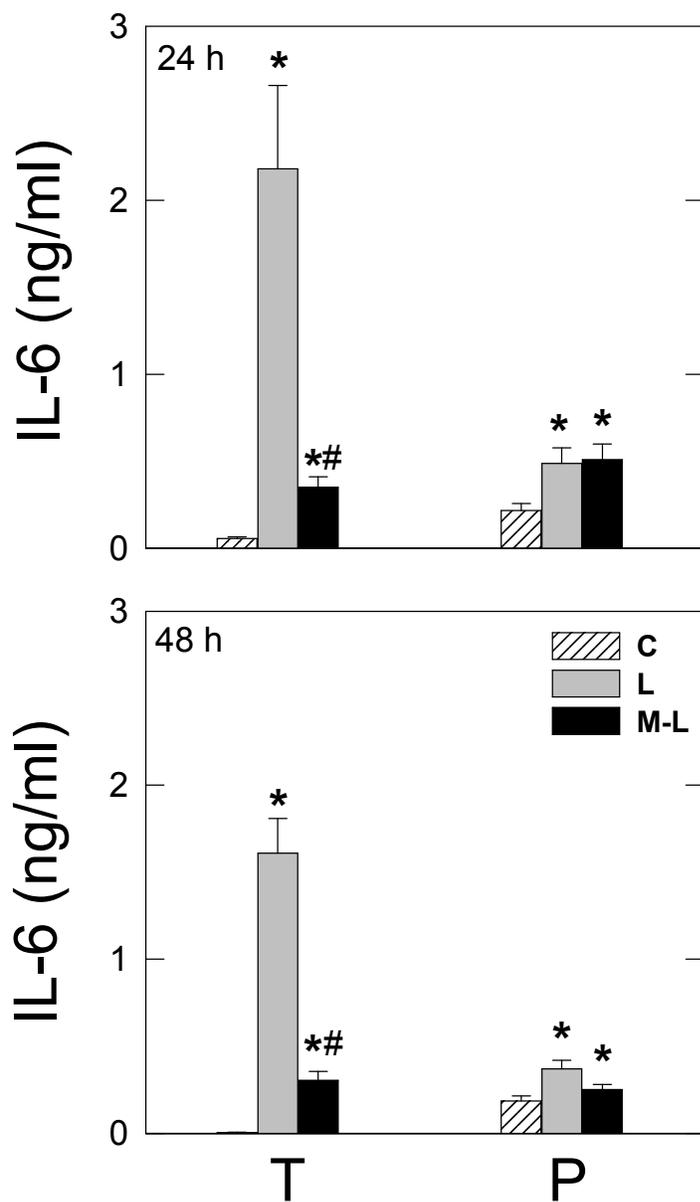


Figura 9 – IL-6 nos grupos controle (C), submetido a LPA (L) e tratado 1 h após a indução da lesão (M-L). Valores correspondem a média \pm EPM de 6 animais por grupo. As dosagens foram realizadas 24 e 48 h após a administração de salina ou LPS de *E. coli*. T: instilação intratraqueal; P: injeção intraperitoneal. * Significativamente diferente de C; # Significativamente diferente de L. ($p < 0,05$)

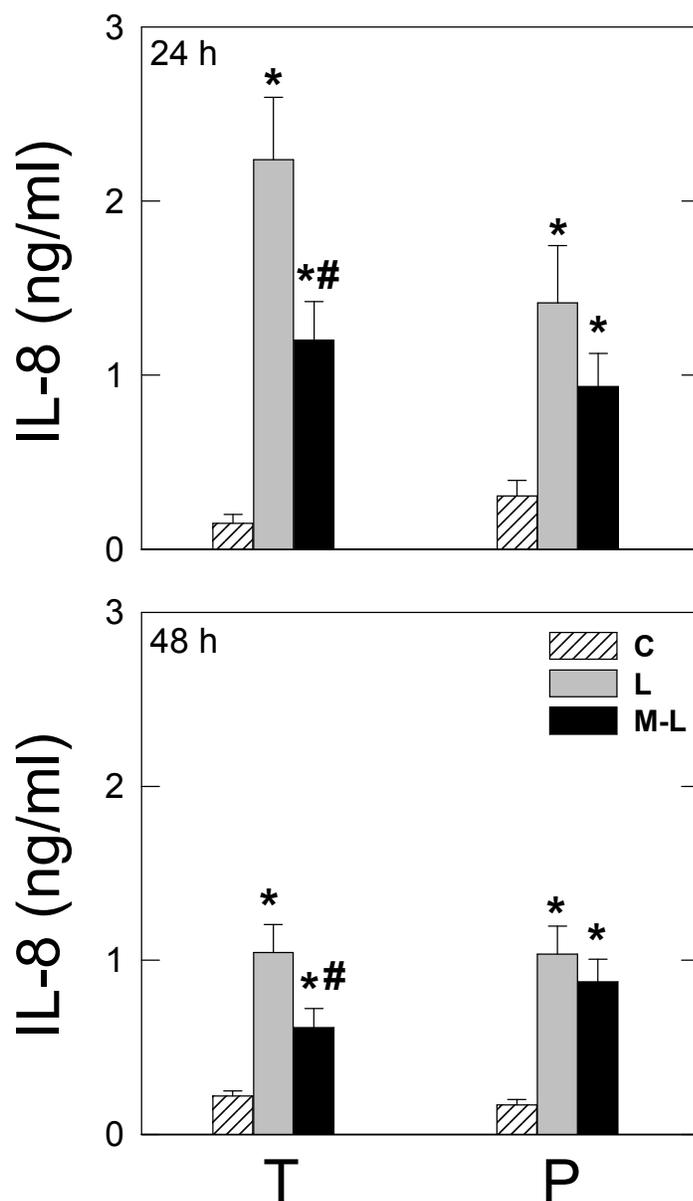


Figura 10 – KC nos grupos controle (C), submetido a LPA (L) e tratado 1 h após a indução da lesão (M-L). Valores correspondem a média \pm EPM de 6 animais por grupo. As dosagens foram realizadas 24 e 48 h após a administração de salina ou LPS de *E. coli*. I: instilação intratraqueal; P: injeção intraperitoneal. * Significativamente diferente de C; # Significativamente diferente de L. ($p < 0,05$)

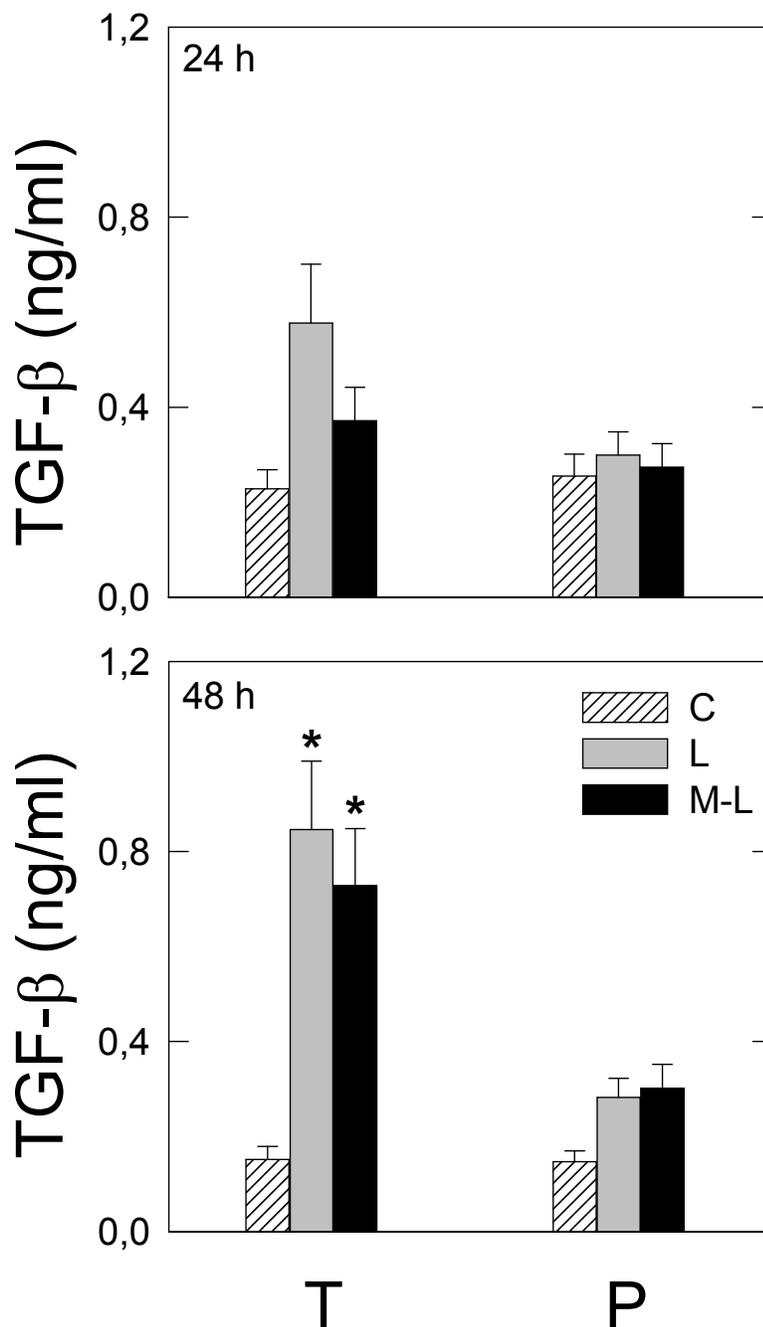


Figura 11 – TGF- β nos os grupos controle (C), submetido a LPA (L) e tratado 1 h após a indução da lesão (M-L). Valores correspondem a média \pm EPM de 5 animais por grupo. As dosagens foram realizadas 24 e 48 h após a administração de salina ou LPS de *E. coli*. I: instilação intratraqueal; P: injeção intraperitoneal. * Significativamente diferente de C ($p < 0,05$).

A quantificação de fibras colágenas e elásticas no septo alveolar é mostrada na Tabela 5 e a análise qualitativa pode ser visualizada nas Figuras 12 e 13. O conteúdo de fibras colágenas elevou-se similarmente nos grupos LT e LP. Não houve alteração do conteúdo de fibras oxitalânicas ou de elaunínicas e elásticas maduras entre os grupos.

Tabela 5. Quantificação de fibras colágenas e elásticas no septo alveolar de camundongos submetidos à lesão pulmonar por via indireta e direta.

| GRUPOS | COL | RF | ORF | O |
|--------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| CP | 0,017 ± 0,00 | 0,209 ± 0,02 | 0,351 ± 0,01 | 0,142 ± 0,01 |
| LP | 0,051 ± 0,01* | 0,185 ± 0,02 | 0,359 ± 0,02 | 0,174 ± 0,03 |
| M-LP | 0,020 ± 0,01 | 0,233 ± 0,01 | 0,352 ± 0,02 | 0,119 ± 0,02 |
| CT | 0,016 ± 0,01 | 0,208 ± 0,01 | 0,399 ± 0,03 | 0,191 ± 0,03 |
| LT | 0,049 ± 0,01* | 0,207 ± 0,01 | 0,385 ± 0,03 | 0,178 ± 0,03 |
| M-LT | 0,020 ± 0,02 | 0,222 ± 0,02 | 0,355 ± 0,02 | 0,133 ± 0,03 |

Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) de camundongos (n=6/grupo) submetidos a injeção intraperitoneal (P) ou a instilação intratraqueal (T) de salina (C) ou LPS de *E. coli* (L). M-L: Metilprednisolona (2 mg/kg i.v.) administrada 1 h após a indução da lesão. COL: Fibras colágenas; RF: Fibras elásticas maduras e elaunínicas; ORF: Fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas (O). *Significativamente diferente de C (p<0,05)

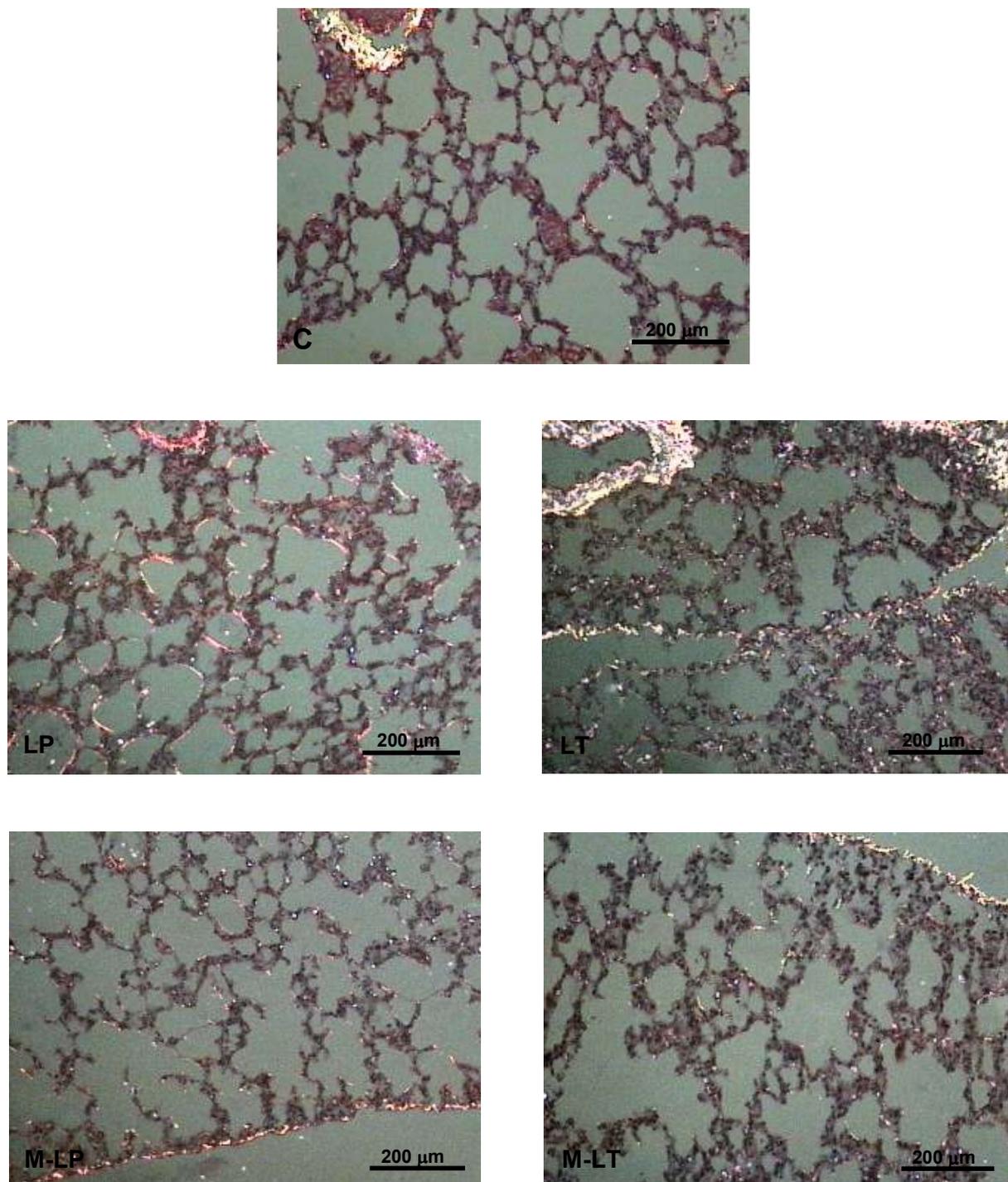


Figura 12 – Fotomicrografias de parênquima pulmonar (aumento 200x) coradas com *Sirius Red* e observadas sob microscopia de luz polarizada. C: Controle; L: LPS *E. coli*; M-L: Metilprednisolona 1 h após a indução da lesão pulmonar. P: injeção intraperitoneal; T: instilação intratraqueal.

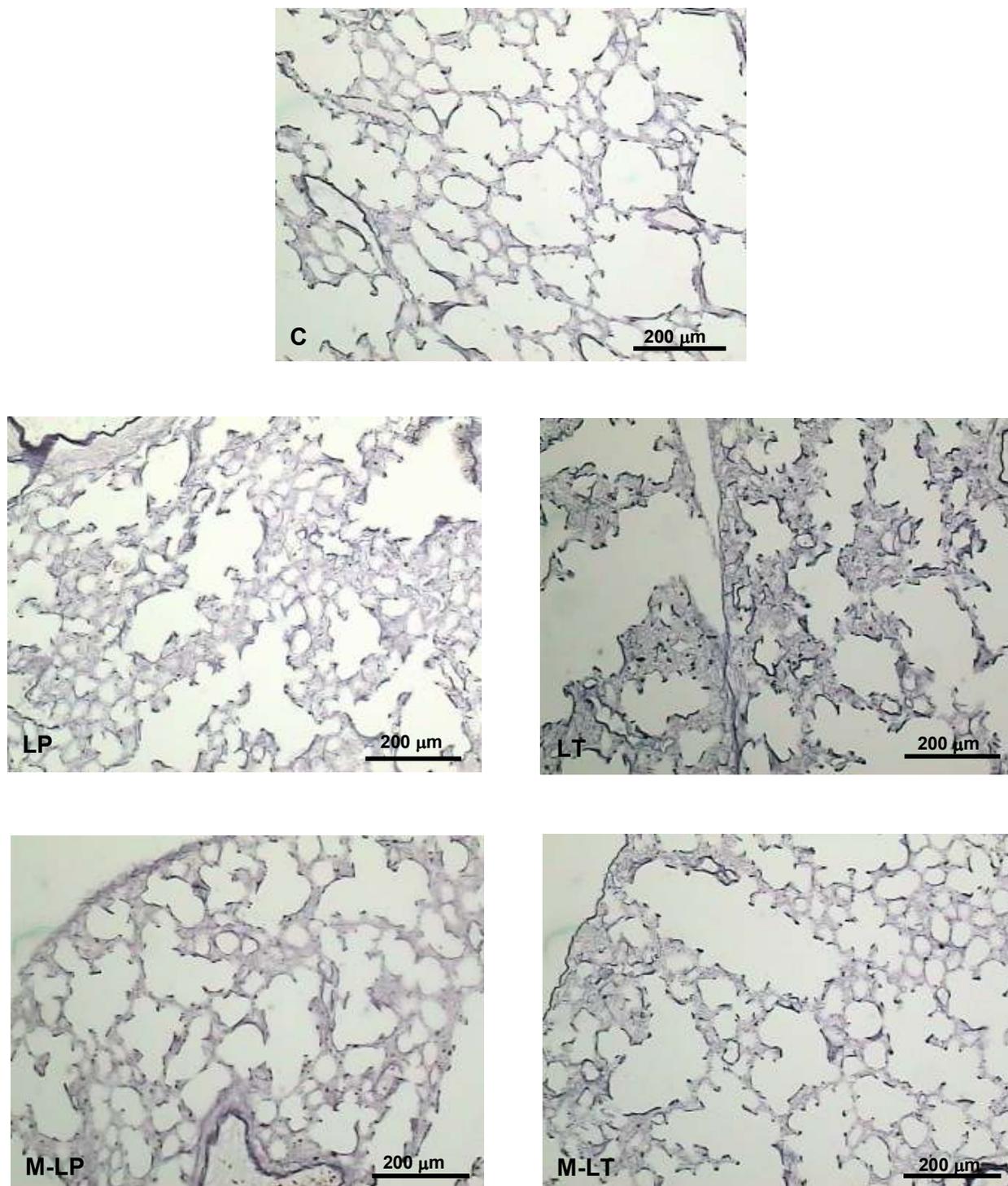


Figura 13 – Fotomicrografias de parênquima pulmonar (aumento 200x) coradas com o método de resorcina-fucsina de Weigert. C: Controle; L: LPS *E. coli*; M-L: Metilprednisolona 1 h após a indução da lesão pulmonar. P: injeção intraperitoneal; T: instilação intratraqueal.

As alterações ultraestruturais são demonstradas nas Figuras 14 a 16. O uso do LPS instilado diretamente no espaço alveolar (grupo LT) causou lesão direta dos pneumócitos tipo II, hiperdistensão ductal, proliferação de fibroblastos ao longo dos septos alveolares, deposição de fibras colágenas tipo III e recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar. No entanto, o endotélio permaneceu íntegro. O grupo M-LT apresentou início de regeneração dos pneumócitos tipo II, redução do conteúdo de colágeno tipo III no septo alveolar, apoptose de fibroblastos e diminuição do recrutamento de neutrófilos. Por outro lado, as alterações foram menos pronunciadas após a indução da lesão pulmonar por via indireta. No grupo LP observou-se ausência de lesão de pneumócitos tipo II, poucos fibroblastos e similar deposição de fibras colágenas, mas com picnose nuclear intensa em células endoteliais. O corticosteróide atenuou as poucas alterações ultraestruturais encontradas.

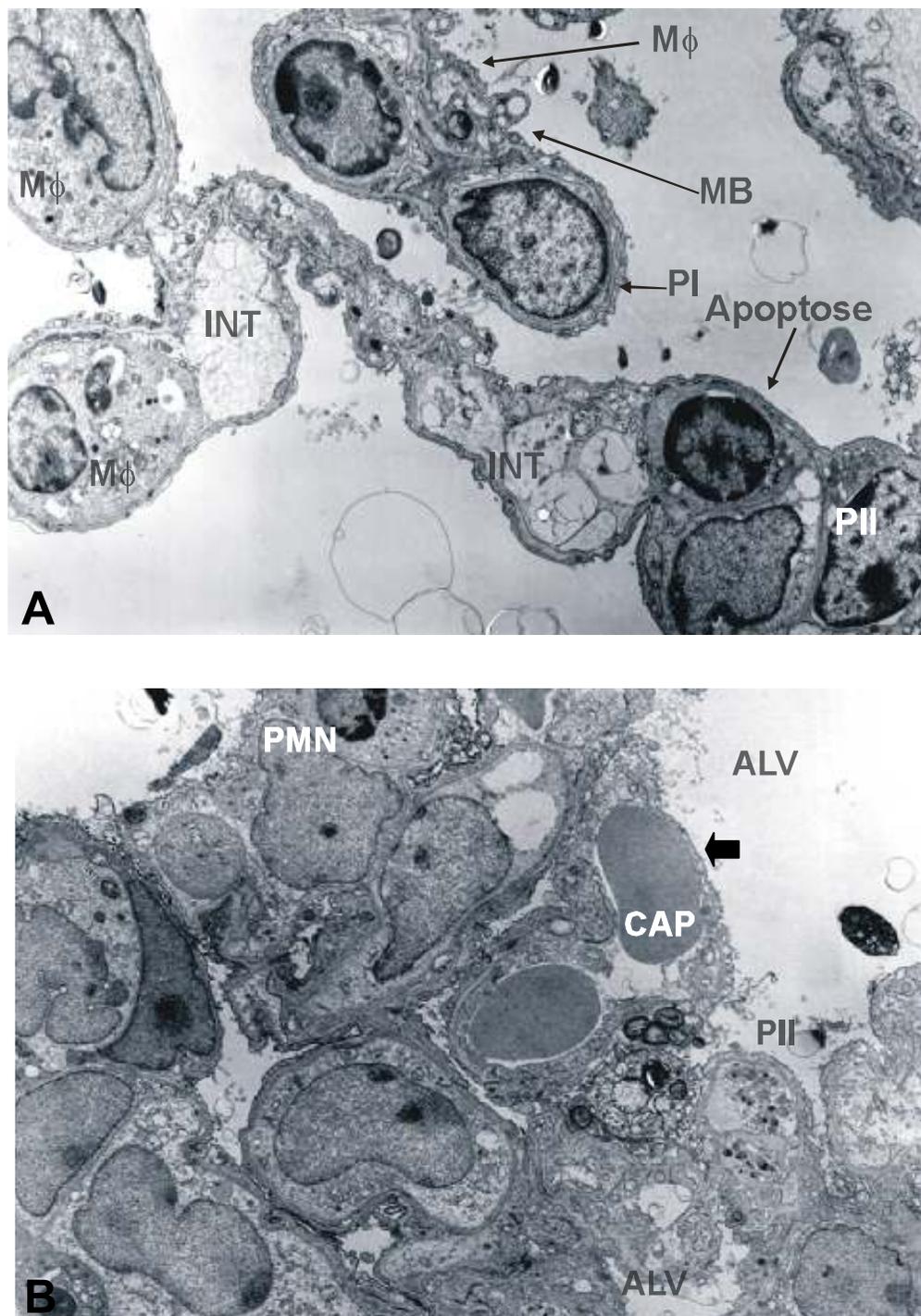


Figura 14 – Fotomicrografias eletrônicas na lesão pulmonar aguda por via direta (LT). **A:** Evidencia-se proliferação de macrófagos ($M\phi$) em atividade, destruição da membrana basal (MB) e apoptose de células epiteliais, e abundante edema intersticial (INT). **B:** Observa-se a presença de polimorfonucleares (PMN) e destruição da barreira alvéolo-capilar (seta). PI: pneumócitos tipo I; PII: pneumócitos tipo II; CAP: capilar; ALV: alvéolo.

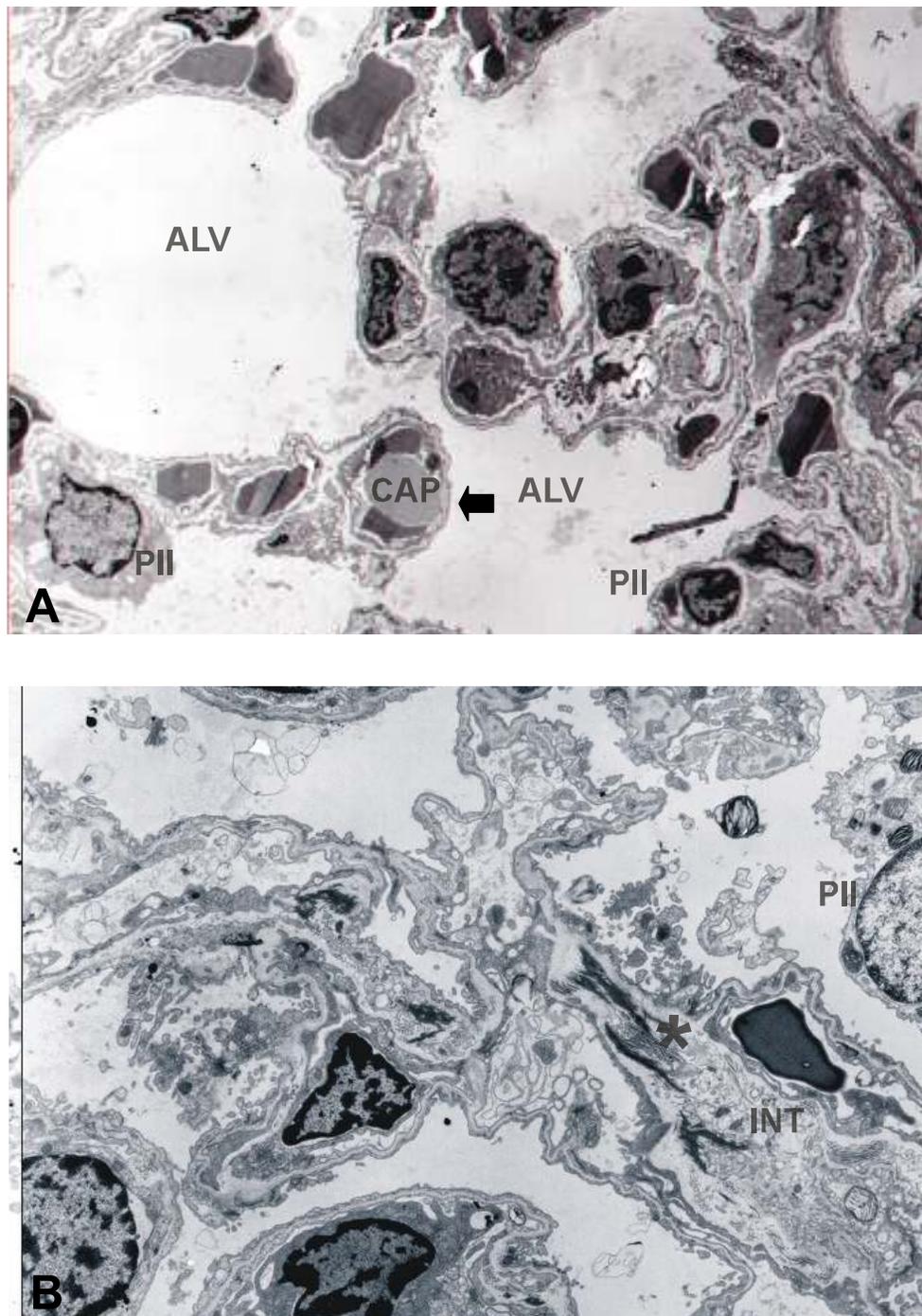


Figura 15 – Fotomicrografia eletrônica na lesão pulmonar aguda por via indireta (LP). As alterações ultraestruturais são mais tênues do que quando induzidas por via direta. **A**: Ausência de destruição importante na barreira alvéolo-capilar (seta), com poucas alterações morfológicas. **B**: Observa-se edema intersticial (*). PII: pneumócitos tipo II; CAP: capilar; ALV: alvéolo; INT: interstício.

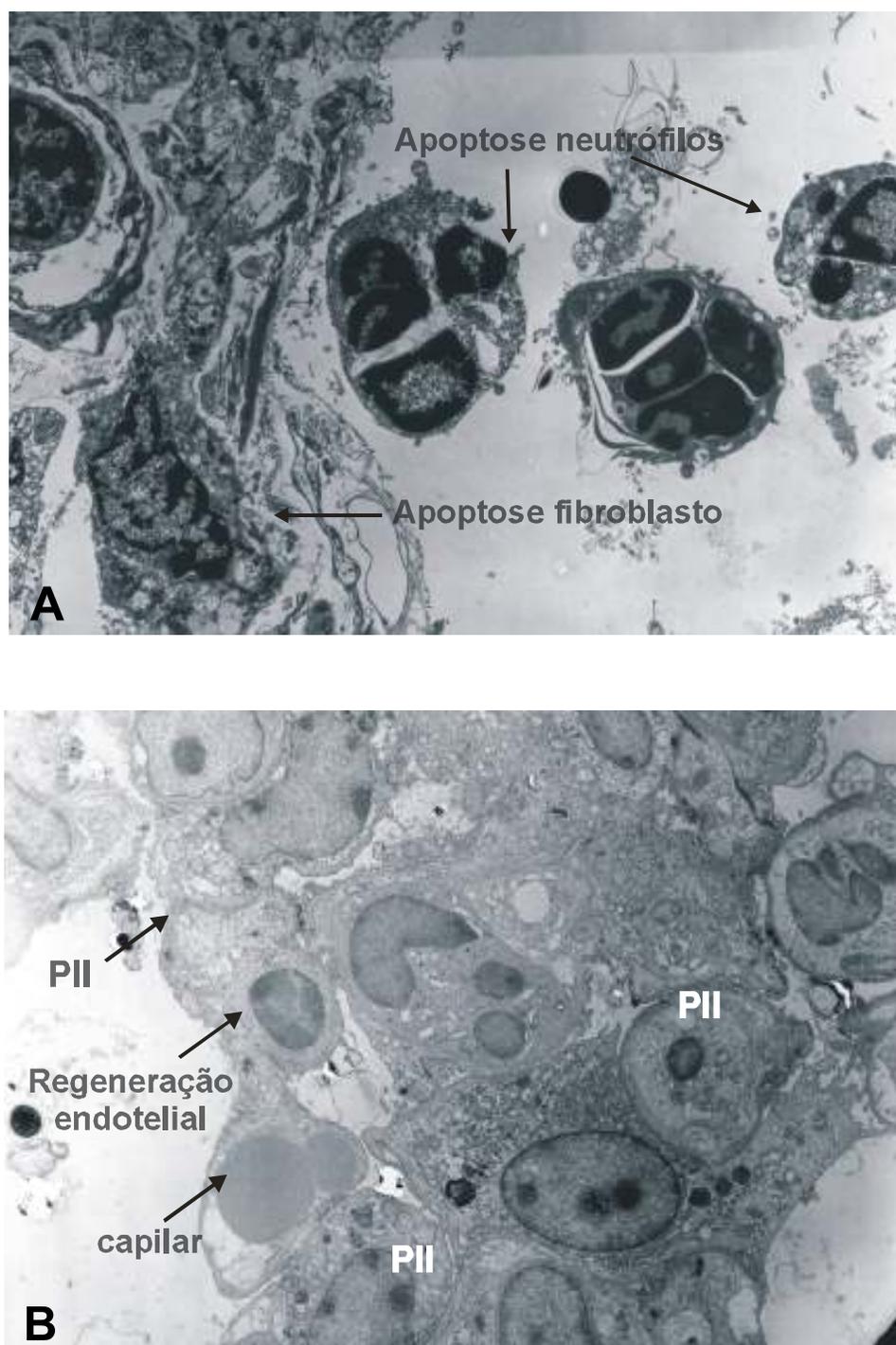


Figura 16 – Fotomicrografia eletrônica de animais tratados com metilprednisolona (2 mg/kg i.v.) 1 h após a indução da lesão pulmonar por via direta (A) ou indireta (B). **A:** Grupo M-LT, evidenciando apoptose de fibroblastos e de células inflamatórias. **B:** Grupo M-LP, demonstrando-se o reparo das células endoteliais. PII: pneumócitos tipo II.

A Tabela 6 demonstra o coeficiente de correlação e o p valor entre os parâmetros funcionais e morfológicos do pulmão. Os valores de percentual de colapso alveolar foram correlacionados com as alterações na elastância estática e na pressão viscoelástica e/ou inomogênea do pulmão. Ao mesmo tempo, as alterações na elastância e resistência teciduais foram correlacionadas com o percentual de polimorfonucleares e a quantificação de fibras colágenas no septo alveolar. Constatou-se que Est e $\Delta P2$ se correlacionaram com a fração de área de colapso, enquanto que E e R se correlacionaram com o percentual de polimorfonucleares e o conteúdo de fibras colágenas.

Tabela 6. Correlação entre parâmetros funcionais e morfológicos

| | Colapso (%) | | | |
|--|--------------------|----------------|--|---------------|
| | T | | P | |
| Est (cmH ₂ O/mL) | 0,672 (0,002) | | 0,664 (0,003) | |
| $\Delta P2$ (cmH ₂ O) | 0,500 (0,034) | | 0,526 (0,025) | |
| | PMN (%) | | Colágeno ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) | |
| | T | P | T | P |
| E (N/m ² .10 ⁴) | 0,752 (<0,001) | 0,725 (<0,001) | 0,495 (0,048) | 0,531 (0,023) |
| R (N.s/m ² .10 ²) | 0,790 (<0,001) | 0,901 (<0,001) | 0,625 (0,006) | 0,535 (0,022) |

P: injeção intraperitoneal; T: instilação intratraqueal; Est: Elastância estática do pulmão; $\Delta P2$: Pressão viscoelástica e/ou inomogênea do pulmão; E: Elastância tecidual; R: Resistência tecidual; PMN: percentual de polimorfonuclear no septo alveolar.

P valor é mostrado entre parênteses.

VI. DISCUSSÃO

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) foram caracterizadas desde sua descrição como uma condição clínica associada à presença de inflamação e aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, levando ao acúmulo de exudato alveolar, infiltrado alveolar neutrofílico e hemorragia (Bernard et al., 2005). Acreditava-se inicialmente que a SDRA seria a forma mais grave de um *spectrum* de lesão pulmonar causada por mecanismos uniformes, os quais seriam independentes da doença precipitante. Estes primeiros estudos relataram que a resposta pulmonar a injúria era estereotipada, caracterizada pelo dano alveolar difuso (DAD), com a transição de dano alveolar agudo para uma fase fibroproliferativa, independentemente da causa inicial (Tomashefski, 2000). No entanto, a maioria destes estudos patológicos analisou as alterações pulmonares na fase tardia da lesão, quando estas já estavam estabelecidas.

As possíveis diferenças entre a LPA direta e indireta podem estar relacionadas a gravidade da lesão. Além disso, é possível que injúrias diretas e indiretas do parênquima pulmonar coexistam, tornando-se difícil a avaliação das duas entidades separadamente. Neste contexto, utilizamos modelos de LPA direta e indireta com mesmo grau de alteração funcional independentemente da etiologia da lesão (Menezes et al., 2005), o que pode ser visto por alterações similares na mecânica pulmonar entre os grupos LT e LP (Figuras 5 e 6). Para tal, doses diferentes de lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* foram administradas por via intratraqueal e intraperitoneal (Menezes et al., 2005).

VI.1. ALTERAÇÕES DA MECÂNICA PULMONAR *IN VIVO* E *IN VITRO*

O método utilizado na determinação da mecânica pulmonar (Bates et al., 1985; Bates et al., 1988) foi o de oclusão ao término da inspiração, que fornece informações individualizadas sobre o componente pulmonar, permitindo a análise dos seus componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inomogêneo.

As resistências pulmonares são dependentes do fluxo e volume (Kochi et al., 1988). Em condições de isovolume, as resistências viscosas do pulmão e do sistema respiratório aumentam linearmente com o aumento do fluxo, enquanto que o componente resistivo relacionado a dissipação de energia para vencer o componente viscoelástico e/ou inomogêneo, diminui exponencialmente. Esse comportamento se reflete na resistência pulmonar total, que é maior em baixos fluxos do que em fluxos intermediários. Na situação de isofluxo, aumentando-se o volume, as resistências viscosas pulmonar e do sistema respiratório decrescem, enquanto que a viscoelástica se eleva (D'Angelo et al., 1989; Kochi et al., 1988). Por esta razão, em nosso trabalho o volume, o fluxo e o tempo inspiratório (T_i) foram mantidos constantes durante todo o tempo em que os animais foram submetidos à ventilação mecânica (Tabela 1).

Estudos prévios em humanos investigaram pacientes com LPA indireta relacionada a causas abdominais. Eles dividiram os parâmetros mecânicos do sistema respiratório nos componentes de pulmão e parede torácica e observaram um significativo aumento na elastância da parede torácica secundária ao aumento da pressão intraabdominal (Gattinoni et al., 1998; Pelosi et al., 2003; Quintel et al., 2004). Entretanto, nosso trabalho analisou apenas o componente

pulmonar do sistema respiratório, uma vez que a parede torácica dos animais era aberta imediatamente antes da medida dos parâmetros mecânicos.

Recentemente, Quintel et al. (2004) observaram que o aumento da pressão intraabdominal elevou a quantidade de edema pulmonar em presença da ruptura da barreira alvéolo-capilar. Apesar de não termos medidos a pressão intraabdominal em nossos animais, acreditamos não ter ocorrido aumento da pressão abdominal já que não foram observadas qualquer distensão abdominal ou ascite no momento da análise funcional.

As elastâncias estática e dinâmica, e as pressões resistiva e viscoelástica e/ou inomogênea do pulmão aumentaram similarmente em ambos os grupos de LPA (Figuras 5 e 6). Estudos prévios descreveram alterações na resistência e elastância na LPA resultantes da redução da capacidade residual funcional devido ao preenchimento alveolar (Grossman et al., 1980; Gregory et al., 1991). O aumento da pressão viscoelástica e/ou inomogênea sugere a presença de heterogeneidades que podem ser devido a muitos fatores: colapso alveolar e hiperdistensão, edema e inflamação com infiltração de neutrófilos.

Em nosso estudo, o uso do corticosteróide na fase aguda da LPA impediu as alterações na mecânica pulmonar somente na LPA direta. É possível que seu efeito benéfico funcional esteja relacionado não apenas à melhora do processo inflamatório, como também por inibição da fibrogênese (Meduri et al., 1991; Meduri et al., 1995).

Para se estudar quais fatores estariam envolvidos especificamente com as propriedades mecânicas do parênquima pulmonar, utilizamos como modelo o retalho do parênquima pulmonar. Vários autores utilizam-no para o estudo das

propriedades mecânicas e farmacológicas da periferia do pulmão (Goldie et al., 1982; Bertram et al., 1983; Goldie et al., 1984; Moretto et al., 1994; Romero et al., 2001). Para tal, é necessário que o retalho do parênquima seja adquirido da região subpleural. Ludwig et al. (Ludwig et al., 1994) demonstraram que a proporção de pequenas vias aéreas, vasos e septos alveolares influenciavam pouco no comportamento mecânico de retalhos pulmonares subpleurais. No entanto, Salerno et al. (Salerno et al., 1995), estudando cortes de parênquima proximais e periféricos, concluíram que o aumento da proporção de vias aéreas em tecidos proximais era capaz de interferir nas propriedades mecânicas oscilatórias durante a indução de constrição. Dessa forma, os retalhos de parênquima obtidos da região subpleural possuem menos vias aéreas e vasos do que os obtidos proximalmente, e apenas retalhos subpleurais podem ser utilizados como modelo para o estudo da mecânica do parênquima pulmonar.

O entendimento dos fatores teciduais que podem contribuir para o comportamento histerético é dificultado pela heterogeneidade das estruturas que compõem o parênquima pulmonar e pela complexa interação entre elas (Fredberg et al., 1989; Ludwig et al., 1994). Vários fatores estão implicados como contribuintes potenciais para a histerese: (1) alterações no comportamento da interface ar-líquido (Mead et al., 1957; Bachofen et al., 1970; Bachofen et al., 1987); (2) interações entre os componentes da matriz extracelular, isto é, fibras colágenas, elásticas e proteoglicanos (Mijailovich et al., 1993; Yuan et al., 2000; Romero et al., 2001, Rocco et al., 2001; 2003; 2004); (3) modificações das propriedades histeréticas dos elementos contráteis localizados no parênquima e nas pequenas vias aéreas (Kapanci et al., 1974; Romero et al., 1998, Xisto et al.,

2005); (4) alterações no mecanismo de recrutamento-desrecrutamento dos espaços alveolares durante o ciclo respiratório (Smaldone et al., 1983).

Freqüentemente as amostras teciduais são preconicionadas e inseridas num recipiente contendo uma solução nutritora. Neste caso, importantes mecanismos que contribuem para a histerese *in vivo*, tais como a interface ar-líquido e áreas de microatelectasias, não estão presentes quando o tecido pulmonar é estudado *in vitro* (Leite-Junior et al., 2003). Conseqüentemente, o tecido pulmonar é considerado um modelo para o estudo dos elementos contráteis e da interação entre as fibras colágenas, elásticas e proteoglicanos da matriz extracelular.

O corticosteróide foi capaz de atenuar as modificações da mecânica tecidual e impedir a fibrogênese tanto na LPA direta como indireta. Logo, os mecanismos de ação do corticosteróide ao inibir a proliferação de fibroblasto e a deposição de fibras colágenas não parecem depender da origem da lesão.

VI.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise da microscopia óptica mostrou incremento similar no colapso alveolar e celularidade tecidual 24 h após a indução da lesão independentemente da etiologia. Entretanto, a análise da microscopia eletrônica na LPA direta evidenciou uma extensa injúria do epitélio alveolar, lesão de pneumócitos tipo I, pneumócitos tipo II intumescidos e fragmentados (corpos lamelares no espaço alveolar), endotélio intacto, recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar, proliferação de fibroblastos no septo alveolar e a presença de fibras colágenas

tipo III e membranas hialinas. No grupo LPA indireta foi observado edema intersticial e a presença de colágeno tipo III e pneumócitos I e II intactos.

Hoelz et al. (2001) descreveram diferenças entre as lesões pulmonares na LPA direta e indireta e observaram predomínio de colapso alveolar, exsudato fibrinoso e edema da parede alveolar na LPA direta. Ao mesmo tempo, identificaram que as diferenças morfológicas entre as síndromes direta e indireta foram principalmente quantitativas em extensão e distribuídas de acordo com a doença subjacente. Entretanto, Hoelz et al. (2001) usaram tecidos de biópsias de pacientes, os quais possuem uma série de limitações: as alterações do parênquima pulmonar são heterogêneas; a dificuldade de obter tecido pulmonar de pacientes na fase aguda, o que contribuiu para que a doença subjacente tivesse diferentes evoluções até a morte do paciente; a presença de lesão associada à ventilação mecânica e pneumonia mesmo quando o insulto inicial era indireto. Neste contexto, nosso modelo murino de LPA direta e indireta não possui estas limitações.

O corticosteróide reduziu o colapso alveolar e a celularidade tanto na LPA direta como na indireta. No entanto, a redução foi mais pronunciada na LPA causada por lesão direta do epitélio alveolar. Quando estes resultados são comparados com os parâmetros mecânicos *in vivo*, seria esperado que a atenuação dos valores do colapso alveolar fosse menor do que o observado no grupo da LPA indireta. Esta aparente discrepância pode ser explicada devido ao fato de que a mecânica respiratória não é um método suficientemente sensível para captar pequenas modificações de colapso alveolar.

A lesão do epitélio alveolar, como ocorre na fase aguda da LPA direta, leva ao preenchimento dos espaços alveolares por edema, dificultando o transporte de oxigênio para o sangue e, conseqüentemente, *shunt* pulmonar e hipoxemia grave não responsiva a oxigenoterapia (Dada et al., 2003). Por esta razão, o grau de lesão epitelial alveolar é um importante fator para predizer a evolução da síndrome (Matthay et al., 1990), e vários estudos sugerem que estratégias visando reduzir o edema pulmonar estão associadas com diminuição do tempo de internação na Unidade de Terapia Intensiva e da taxa de mortalidade (Sznajder et al., 2001; Ware et al., 2002).

A quantificação da celularidade no BALF (Tabela 4) evidencia o preenchimento do espaço alveolar por um infiltrado neutrofílico pronunciado na LPA direta, o que não ocorre na LPA indireta. Por outro lado, o aumento da celularidade no septo alveolar independe da origem da lesão, e o corticosteróide foi capaz de reduzir o recrutamento de neutrófilos para o parênquima pulmonar tanto na lesão direta como na indireta. No entanto, esta redução é mais pronunciada na LPA direta (Figura 8). Estes achados sugerem que a ação do corticosteróide depende do compartimento pulmonar envolvido, sendo mais efetivo quando a lesão primária é epitelial.

VI.3. INFLAMAÇÃO

Os níveis de citocinas inflamatórias (IL-6 e KC) no BALF foram quantificados e correlacionados com a função pulmonar e morfometria. Apesar das alterações funcionais e morfológicas pulmonares terem sido similares independentemente da etiologia da lesão, a injúria direta apresentou resposta

inflamatória mais pronunciada (Figura 9 e 10). Estes achados estão em conformidade com estudos prévios (Menezes et al., 2005), evidenciando que os mecanismos subjacentes vistos são diferentes nas duas condições, e que isto pode influenciar o tratamento.

O LPS é capaz de interagir com leucócitos e outras células, tais como as endoteliais, e modula seus efeitos patológicos através da indução de segundos mensageiros, tais como as citocinas (Ware and Matthay, 2000, Menezes et al., 2005). Conseqüentemente, era de se esperar que na LPA indireta o LPS interagisse inicialmente com células localizadas no peritônio, e que estas produzissem citocinas que surgiriam elevadas mais tardiamente no BALF. Dessa forma, as diferenças na dosagem de citocinas entre os grupos com lesão pulmonar direta e indireta poderiam ocorrer apenas devido ao fator temporal. Para elucidar esta questão, a dosagem de citocinas no BALF foi realizada 24 e 48 horas após a indução da lesão, confirmando que existe uma resposta inflamatória mais intensa na LPA direta em comparação à indireta, independentemente do tempo de análise e a despeito das alterações funcionais serem similares.

O NF- κ B é um fator de transcrição fundamental no desenvolvimento da resposta inflamatória neutrofílica secundária a lesão tecidual. É encontrado essencialmente em todos os tipos celulares e está envolvido na ativação de vários genes alvos (Rhen e Cidlowski, 2005). O corticosteróide inibe a transcrição de várias citocinas importantes na patogênese da LPA (incluindo IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- α e GM-CSF), principalmente devido ao seu efeito inibitório sobre o NF- κ B (Fernandes et al., 2005). Em nosso estudo, no entanto, o

corticosteróide inibiu o aumento de IL-6 e KC (IL-8) apenas na LPA direta (Figuras 14 e 15).

A resposta de uma única célula exposta ao corticosteróide depende de vários fatores: (1) a concentração da fração livre do hormônio; (2) a potência relativa do hormônio, influenciada pela atividade biológica e afinidade do GR no núcleo; e (3) a capacidade da célula de receber e transduzir o sinal hormonal. Neste sentido, estudos *in vitro* têm mostrado que várias citocinas podem induzir resistência ao glicocorticóide por reduzir a afinidade de ligação do GR ao cortisol e/ou ao GRE (Almawi et al., 1991). Ao mesmo tempo, vários estudos evidenciaram aumento dos níveis do cortisol plasmático em pacientes com sepse, o que pode refletir um bloqueio da atividade do esteróide ou do seu transporte como consequência da infecção (Briegel et al., 1991).

VI.4. REMODELAMENTO

O conteúdo de fibras colágenas aumentou similarmente 24 h após a injúria tecidual na LPA direta e indireta (Tabela 5), indicando que processos bioquímicos implicados na síntese do colágeno são capazes de reagir rapidamente com a agressão (Rocco et al., 2001; Rocco et al., 2003; 2004; Santos et al., 2006). Além disso, fibras colágenas tipo III foram identificadas com microscopia eletrônica. Tem sido descrito que fibras colágenas tipo III, que são mais flexíveis e susceptíveis à quebra, aparecem precocemente no curso da lesão pulmonar (Raghu et al., 1985). Além disso, o corticosteróide impediu a deposição de colágeno por mecanismos que agem independentemente da etiologia da lesão pulmonar.

A quantidade de colágeno depositado depende da extensão da lesão celular, da intensidade da proliferação de fibroblastos e de substâncias efetoras presentes na inflamação, do grau de hipoperfusão do leito vascular e de alterações da PaO_2 que ocorrem durante a injúria pulmonar.

Brody e colaboradores (1981) sugeriram que a injúria direta da célula epitelial e de sua membrana basal seria fundamental para que o processo fibrótico ocorresse. Ao contrário, no presente modelo, não observamos diferenças no conteúdo do colágeno depositado entre os grupos. Entretanto, nosso estudo foi realizado na fase precoce da lesão. Santos e colaboradores (2006) observaram que apesar do número de fibras colágenas ser similar 24 horas após a indução da lesão, a LPA direta evolui com fibrogênese enquanto a LPA indireta repara a lesão. Ao mesmo tempo, estudos mais recentes têm demonstrado que a fibroproliferação também ocorre na microcirculação, podendo inclusive resultar na redução da área de seção transversa da vasculatura pulmonar e hipertensão pulmonar (Dhainaut et al., 2003).

O presente estudo mostrou que o conteúdo de fibras elásticas não aumentou precocemente no curso da lesão pulmonar em ambos os grupos (Tabela 5). A ausência de elastose neste modelo de LPA poderia ser atribuída a intensidade da lesão pulmonar (Rocco et al., 2001; Rocco et al., 2004). Rocco e colaboradores (2003) observaram que, com doses altas de paraquat (25 mg/kg), a elastogênese ocorreu precocemente no curso da lesão pulmonar, e com 10 mg/kg ocorreu um incremento tardio no conteúdo de fibras elásticas. Portanto, existe um grau de lesão pulmonar responsável pelo início da elastogênese independentemente do tempo de curso da lesão pulmonar (Rocco et al., 2003).

Além disso, os mecanismos que promovem o início da elastogênese são diferentes dos da fibrogênese propriamente dita.

O TGF- β tem um papel fundamental no reparo tecidual após lesão de muitos órgãos, incluindo os pulmões (Shull et al., 1992). Na LPA, o papel do TGF- β foi avaliado mais detalhadamente durante a fase tardia, onde teria papel crítico no desenvolvimento da resposta fibroproliferativa (Broekelmann et al., 1991; Giri et al., 1993). No entanto, nosso trabalho evidenciou que os níveis de TGF- β encontram-se aumentados precocemente na LPA, e que este aumento é dependente da etiologia da lesão (direta x indireta). Da mesma forma, estudos que analisaram a expressão gênica da LPA induzida por bleomicina demonstram que os níveis de expressão de muitos genes induzidos por TGF- β estão aumentados tão precocemente como 2 dias após a indução da lesão (Kaminski et al., 2000), quando ainda não se atingiu o pico máximo de edema alveolar. Adicionalmente, Pittet e colaboradores (Pittet et al., 2001) demonstraram que o aumento do TGF- β nestes casos parece ser mediado pela $\alpha_v\beta_6$, uma integrina que localmente ativa o TGF- β latente na matriz (Munger et al., 1999).

Vários autores têm investigado os mecanismos pelos quais o TGF- β participaria do desenvolvimento do edema alveolar. O TGF- β aumenta a permeabilidade do epitélio alveolar *in vitro* por mecanismos que envolvem a depleção intracelular do glutathione e o aumento na concentração da sua forma oxidada, o glutathione dissulfeto (Bunnell et al., 1993; Guidot et al., 2000; Rao et al., 2000), possivelmente devido à inibição da síntese do glutathione nas células epiteliais alveolares pelo aumento da transcrição da γ -glutamylcisteína sintase

(Arsalane et al., 1997), e pelo seu próprio efeito pró-oxidante, aumentando a produção celular de H_2O_2 (Das et al., 1991).

Adicionalmente, o TGF- β pode inibir a expressão de componentes do surfactante e a maturação das células epiteliais em culturas de células pulmonares fetais humanas (Beers et al., 1998), e aumenta a apoptose mediada por Fas nas células epiteliais pulmonares (Hagimoto et al., 2002).

Ao mesmo tempo, o TGF- β é capaz de aumentar a permeabilidade endotelial através do aumento de *gap junctions* entre as células endoteliais (Hurst et al., 1999). Este efeito parece resultar da contração da célula endotelial secundária a ativação da cascata de sinalização dependente da cinase de cadeia leve da miosina (Hurst et al., 1999). Entretanto, o efeito *in vitro* do TGF- β na integridade do endotélio vascular inicia-se dentro de 1-2 horas, atingindo o pico máximo em 8-9 horas após a exposição ao TGF- β , e parece ser dependente do estado proliferativo e do grau de confluência da monocamada de células endoteliais, uma vez que células quiescentes são resistentes a este efeito (Sutton et al., 1991).

Dhainaut e colaboradores (1999) demonstraram que pacientes na fase precoce da LPA têm altas concentrações de TGF- β no fluido do lavado broncoalveolar, e que estas concentrações são correlacionadas com a diminuição da relação PaO_2/FiO_2 , sugerindo um importante papel para TGF- β no desenvolvimento da LPA em humanos. Adicionalmente, Hamacher e colaboradores (2002) encontraram altas concentrações de TGF- β no fluido do lavado broncoalveolar na fase precoce da LPA em humanos. No entanto, ao contrário do TNF- α e da angiostatina, o TGF- β não contribuiu para lesão

endotelial associada a LPA nestes pacientes, indicando que o TGF- β poderia agir diferentemente no epitélio alveolar e no endotélio vascular. Nesse contexto, observou-se que o aumento de TGF- β foi maior na LPA direta do que na indireta, sugerindo seu papel na perpetuação da fibrogênese (Santos et al., 2006). Entretanto, o esteróide não foi capaz de reduzir a quantidade de TGF- β no BALF. Similarmente, Khalil e colaboradores (1993) observaram em modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, que o corticosteróide não foi capaz de inibir a secreção de TGF- β mesmo em presença de altas concentrações de esteróide (Khalil et al., 1993).

VI.5. POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO CORTICOSTERÓIDE NA LPA

Por ser um potente agente antiinflamatório, o corticosteróide foi testado desde o início como tratamento da LPA, mas seus resultados sempre se mostraram controversos. Ao mesmo tempo, as várias etiologias da LPA não foram consideradas em nenhum estudo epidemiológico nem experimental. Desde que a patogênese da LPA varia se a injúria do parênquima pulmonar é direta ou indireta (Gattinoni et al., 1998; Pelosi et al., 1999, Menezes et al., 2005), é possível que os corticosteróides atuem diferentemente dependendo da etiologia da lesão.

A terapia com corticosteróide na SDRA foi estudada em três diferentes situações: (1) Como prevenção em pacientes de alto risco (Weigelt et al., 1985; Bone et al., 1987); (2) No tratamento da fase precoce da síndrome com altas doses e tempo reduzido (Bernard et al., 1987); (3) Na terapia prolongada nos

casos refratários (Meduri et al., 1998a). Nas duas primeiras situações, ao se utilizar altas doses dos esteróides (30 mg/kg a cada 6h), nenhum benefício foi demonstrado ou até mesmo ocorreu piora nos pacientes submetidos a corticoterapia. Outros estudos multicêntricos randomizados que investigaram o uso precoce do corticosteróide na LPA falharam em demonstrar algum benefício dos esteróides (Cronin et al., 1995; Lefering et al., 1995). Mais recentemente, Chen et al. (2003) estudaram o uso da metilprednisolona na dose de 30 mg/kg em modelos de LPA induzida por paraquat em ratos, administrada como dose única concomitantemente a indução da lesão ou como dose diária por três dias. Estes autores encontraram no grupo tratado uma melhora da oxigenação medida pelo aumento da PaO_2/FiO_2 , maior volume pulmonar e redução da contagem de células inflamatórias no fluido do lavado broncoalveolar. Além disso, este efeito foi dependente da dose, confirmando o potente efeito antiinflamatório do corticosteróide na LPA.

Meduri e colaboradores ao estudar o efeito do corticosteróide em menor dose [Metilprednisolona (MP), 2 mg/kg a cada 6 h] na fase tardia da LPA (Meduri et al., 1998a) demonstraram redução significativa na mortalidade do grupo que recebeu o corticosteróide. No entanto, este estudo foi criticado por possuir um grande número de variáveis confundidoras: foi encontrada uma maior proporção de fatores de riscos para LPA direta (como pneumonia ou aspiração) no grupo placebo (6/8, 75%) do que no MP (9/16, 56%), o grupo placebo era composto por pacientes cujas medidas fisiológicas identificaram um quadro clínico de maior gravidade, sendo o estudo interrompido precocemente com um número de pacientes aquém do calculado inicialmente (24/99). A fim de vencer estas

limitações, a partir de 1999, o *National Institute of Health* (NIH) desenvolveu um estudo clínico multicêntrico comparando o efeito do corticosteróide com o placebo na fase tardia da SDRA (após 7 dias do início da síndrome). Apesar dos pacientes tratados com esteróide terem sido retirados da prótese ventilatória mais precocemente em relação ao placebo (14 dias vs 23 do grupo placebo), apresentarem melhora da oxigenação e da complacência estática, eles retornavam mais freqüentemente ao respirador devido a fraqueza muscular e neuropatia associadas ao uso do esteróide. Além disso, a mortalidade em 60 dias foi semelhante nos dois grupos. Logo, esse estudo teve que ser interrompido, com resultados desanimadores.

Recentemente, vários trabalhos que investigaram o uso do corticosteróide na sepse demonstraram resultados interessantes (Annane et al., 2002). Estes estudos tomam por base o fato de que doenças graves, tais como trauma, pneumonia, sepse e grandes cirurgias são acompanhados da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). O hormônio adrenocorticotrópico sérico (ACTH) e a dosagem de cortisol encontram-se elevadas, e a ativação do eixo HHA é um importante componente da adaptação ao estresse (Chrousos et al., 1995; Lamberts et al., 1997), sendo capaz de influenciar não só a resposta inflamatória da fase precoce da LPA como também a velocidade e o grau de fibroproliferação (Meduri et al., 1998b). O cortisol tem sido implicado na manutenção da integridade epitelial e da permeabilidade vascular (MacLaren et al., 2002). Também modula grande número de citocinas pró e antiinflamatórias, e tem um papel chave na homeostase do sistema imune (Thompson, 2003).

Por outro lado, muitos autores acreditam que condições caracterizadas como insuficiência adrenal relativa em pacientes com sepse e/ou LPA poderiam estar implicadas na piora do prognóstico se não tratadas (Meduri et al., 2006). Tais casos são caracterizados pela limitação da reserva adrenal, quando não ocorre o aumento esperado da concentração plasmática do cortisol após estímulo com ACTH. Conseqüentemente, os pacientes que receberam um desafio intravenoso com 250 µg de cosyntropina (análogo sintético do ACTH) e cujo aumento do cortisol plasmático seja ≤ 9 µg/dl são caracterizados como não responsivos. Utilizando o teste de estimulação com cosyntropina, Annane e colaboradores (2000) demonstraram que pacientes não responsivos com choque séptico apresentaram taxa de mortalidade aumentada após 28 dias do início da LPA (73% x 40%). Além disso, outros mecanismos somados à diminuição da reserva adrenal poderiam estar implicados no pior prognóstico neste caso, tais como a diminuição dos níveis plasmáticos da globulina ligadora do cortisol, que reduz a liberação tecidual do hormônio; e a capacidade da IL-1 β , IL-2 e IL-6 em reduzir a afinidade do receptor do cortisol em estados de inflamação persistente (MacLaren et al., 2002). Conseqüentemente, a redução da produção do cortisol, a redução da liberação do cortisol nos tecidos e a resistência tecidual ao cortisol poderiam ser responsáveis pela perpetuação do processo inflamatório na LPA.

Annane e colaboradores (2002) testaram a terapêutica com hidrocortisona e fludrocortisona por 7 dias em pacientes com choque séptico que recebiam ventilação mecânica. O corticosteróide melhorou a sobrevida em 76% entre os pacientes classificados como não responsivos, enquanto houve uma tendência em reduzir a sobrevida no grupo de pacientes sem insuficiência adrenal relativa.

Recentemente, Annane e colaboradores (2006) investigaram o uso de baixas doses de hidrocortisona (200 mg/dia, por 7 dias) em pacientes com choque séptico associado ou não a SDRA. A SDRA estava presente em > 50% dos pacientes com choque séptico recrutados neste estudo randomizado. Os autores analisaram um subgrupo de 129 pacientes com SDRA associada a sepse, que foram classificados como não responsivos ao teste com cosyntropina. Eles demonstraram que o uso do corticosteróide por 7 dias em baixas doses foi capaz de reduzir significativamente a duração da ventilação mecânica e a taxa de mortalidade hospitalar nestes pacientes (79% x 60%), o que não foi observado em pacientes responsivos com SDRA ou em qualquer grupo de pacientes apenas com sepse.

VI. CONCLUSÃO

A LPA possui mecanismos fisiopatológicos distintos na dependência da etiologia da lesão, se por lesão direta do epitélio alveolar ou, indiretamente, com lesão inicial do endotélio vascular.

Os parâmetros da mecânica *in vivo* e morfométricos aumentaram similarmente em ambos os grupos de LPA, e o uso do corticosteróide impediu estas alterações apenas quando induzidas por via direta.

Apesar da similaridade no grau de lesão funcional entre os grupos, a LPA direta apresentou resposta inflamatória mais intensa, com aumento significativo de neutrófilos e citocinas no lavado broncoalveolar. Ao mesmo tempo, o corticosteróide reduziu IL-6 e KC no BALF somente nos animais com LPA direta.

No entanto, o corticosteróide impediu as alterações da mecânica tecidual em ambos os grupos. Similarmente, o esteróide impediu a fibrogênese. Logo, os mecanismos de ação do esteróide no remodelamento do parênquima não dependem da origem da lesão.

REFERÊNCIAS

1. ABRAHAM, E. Neutrophils and acute lung injury. **Crit. Care Med.**, 31: S195-S199, 2003.
2. ABRAHAM, E. NF- κ B activation. **Crit. Care Med.**, 28: N100-N104, 2000a.
3. ABRAHAM, E.; CARMODY, A.; SHENKAR, R. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, 279: L1137-L1145, 2000b.
4. ADAMS, D.M.; MATHAWAY, M.; SHAW, J. TGF- β induces human T-lymphocyte migration *in vitro*. **J. Immunol.**, 147: 609, 1991.
5. ADAMSON, I.Y.R.; BOWDEN, D.H. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration: A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. **Lab. Invest.**, 30: 35-42, 1974.
6. ADERKA, D.; LE, J.; VILCEK, J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. **J. Immunol.**, 143: 3517-3523, 1989.
7. ALBERTINE, K.H. Ultrastructural abnormalities in increased-permeability pulmonary edema. **Clin. Chest Med.**, 6: 345-366, 1985.
8. ALMAWI, W.Y.; BEYHUM, H.N.; RAHME, A.A.; RIEDER, M.J. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. **J. Leukoc. Biol.**, 60: 563-572, 1996.
9. ALMAWI, W.Y.; LIPMAN, M.L.; STEVENS, A.C.; ZANKER, B.; HADRO, E.T.; STROM, T.B. Abrogation of glucocorticoid-mediated inhibition of T cell

- proliferation by the synergistic action of IL1, IL-6 and IFN-gamma. **J. Immunol.**, 146: 3523-3527, 1991.
10. ANNANE, D.; SEBILLE, V.; BELLISSANT, E. Effect of low doses of corticosteroid in septic shock patients with or without early acute respiratory distress syndrome. **Crit. Care Med.**, 34: 22-30, 2006.
 11. ANNANE, D.; SEBILLE, V.; CHARPENTIER, C. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. **J.A.M.A.**, 288: 862-871, 2002.
 12. ANNANE, D.; SEBILLE, V.; TROCHE, G. A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. **J.A.M.A.**, 283: 1038-1045, 2000.
 13. ANDERSON, R.R.; HOLLIDAY, R.L.; DRIEDGER, A.A.; LEFCOE, M.; REID, B.; SIBBALD, W.J. Documentation of pulmonary capillary permeability in the adult respiratory distress syndrome accompanying human sepsis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 119: 869-877, 1992.
 14. ARSALANE, K.; DUBAS, C.M.; MUANZA, T. TGF- β 1 is a potent inhibitor of glutathione synthesis in the lung epithelial cell line A549: Transcriptional effect on the GSH rate-limiting enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 17: 599-607, 1997.
 15. ARTIGAS, A.; BERNARD, G.R.; CARLET, J.; DREYFUSS, D.; GATTINONI, L.; HUDSON, L.; LAMY, M.; MARINI, J.J.; MATTHAY, M.A.; PINSKY, M.R.; SPRAGG, R.; SUTER, P.M.; AND THE CONSENSUS COMMITTEE. The american-european consensus conference on ARDS, part 2. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 157: 1332-1347, 1998.

16. ASHBAUGH, D.G.; BIGELOW, D.B.; PETTY, T.L.; LEVINE, B.E. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, 2: 319-323, 1967.
17. AUPHAN, N.; DIDONATO, J.A.; ROSETTE, C.; HELMBERG, A.; KARIN, M. Immunossuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. **Science**, 270: 286-290, 1995.
18. AUSTIN, J.H.M.; MÜLLER, N.L.; FRIEDMAN, P.J.; HANSELL, D.M.; NAIDICH, D.P.; REMY-JARDIN, M.; WEBB, W.R.; ZERHOUNI, E.A. Glossary of terms for CT of the lungs: recommendations of the nomenclature committee of the Fleischner Society. **Radiology**, 200: 327-331, 1996.
19. BACHOFEN, H.; HILDEBRANDT, J.; BACHOFEN, M. Pressure-volume curves of air- and liquid-filled excised lungs - surface tension in situ. **J. Appl. Physiol.**, 29: 422-431, 1970.
20. BACHOFEN, H.; SCHÜRCH, S.; URBINELLI, M.; WEIBEL, E.R. Relations among alveolar surface tension, surface area, volume, and recoil pressure. **J. Appl. Physiol.**, 62: 1878-1887, 1987.
21. BALK, R.; BONE, R.C. The adult respiratory distress syndrome. **Med. Clin. North Am.**, 67: 685-700, 1983.
22. BARNES, P.J. Beta-adrenergic receptors and their regulation: state of the art. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 152: 838-860, 1995.
23. BARNES, P.J. Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 154: S21-S27, 1996.
24. BATES, J.H.T.; HUNTER, I.W.; SLY, P.D.; OKUBO, S.; FILIATRAULT, S.; MILIC-EMILI, J. Effect of valve closure time on the determination of respirator

- resistance by flow interruption. **Med. & Biol. Eng. & Comput.**, 25: 136-140, 1987.
25. BATES, J.H.T.; LUDWIG, M.S.; SLY, P.D.; BROWN, K.; MARTIN, J.G.; FREDBERG, J.J. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. **J. Appl. Physiol.**, 65: 408-414, 1988.
26. BATES, J.H.T.; ROSSI, A.; MILIC-EMILI, J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. **J. Appl. Physiol.**, 58: 1840-1848, 1985.
27. BEERS, M.F. ; SOLARIN, K.O. ; GUTTENTAG, S.H. TGF- β inhibits surfactant component expression and epithelial cell maturation in cultured human fetal lung. **Am. J. Physiol.**, 275: L950-L960, 1998.
28. BELLINGAN, G.J. Resolution of inflammation and repair. **Eur. Respir. Mongr.**, 7: 70-82, 2002.
29. BERNARD, G.R. Acute Respiratory Distress Syndrome. A historical perspective. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 172: 798-806, 2005.
30. BERNARD, G.R.; ARTIGAS, A.; BRIGHAM, K.L.; CARLET, J.; FALKE, K.; HUDSON, L.; LAMY, M.; LEGALL, J.R.; MORRIS, A.; SPRAGG, R.; AND THE CONSENSUS COMMITTEE. The American-European Consensus Conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 149: 818-824, 1994.
31. BERNARD, G.R.; LUCE, J.M.; SPRUNG, C.L.; RINALDO, J.E.; TATE, R.M.; SIBBALD, W.J.; KARIMAN, K.; HIGGINS, S.; BRADLEY, R.; METZ, C.A.;

- HARRIS, T.R.; BRIGHAN, K.L. High dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. **N. Engl. J. Med.**, 31: 1565-1570, 1987.
32. BERTRAM, J.F.; GOLDIE, R.G.; PAPADIMITRIOU, J.M.; PATERSON, J.W. Correlations between pharmacological responses and structure of human lung parenchymal strips. **Br. J. Pharmacol.**, 80: 107-114, 1983.
33. BIRBACH, A.; GOLD, P.; BINDER, B.R. Signaling molecules of the NF- κ B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. **J. Biol. Chem.**, 277: 10842-10851, 2002.
34. BLOBE, G.C.; SHIEMANN, W.P.; LODISH, H. Role of TGF- β in human disease. **New Engl. J. Med.**, 342: 1350-1358, 2000.
35. BONE, R.C.; FISHER, C.J.; CLEMMER, T.P.; SLOTMAN, G.J.; METZ, C.A.; BALK R.A. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. **N. Engl. J. Med.**, 317: 653-658, 1987.
36. BONE, R.C.; GRODZIN, C.J.; BALK, R.A. Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, 112: 235-243, 1997.
37. BORDER, W.A.; RUOSLAHTI, E. TGF- β in disease: The dark side of tissue repair. **J. Clin. Invest.**, 90: 1-6, 1992.
38. BOZZETTE, S.A.; SATTler, F.R.; CHIU, J.; WU A.W., GLUCKSTEIN D., KEMPER C., BARTOK A., NIOSI J., ABRAMSON I., COFFMAN J. A controlled trial of early adjunctive treatment with corticosteroids for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, 323: 1451-1457, 1990.

39. BOZIC, C.R.; GERARD, N.P.; VON UEXKULL-GULDENBAND, C.; KOLAKOWSKI, L.F.J.; MARYROSE, J.C.; BRESLOW, R.; SHOELL, H.J.; GERARD, C. The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. **J. Biol. Chem.**, 269: 29355-29358, 1994.
40. BRAUDE, S.; HASLAM, P.; HUGHES, D.; MACNAUGHTON, P.; EVANS, T.W. Chronic adult respiratory distress syndrome: a role for corticosteroids? **Crit. Care Med.**, 20: 1187-1189, 1992.
41. BRIEGEL, J.; FORST, H.; HELLINGER, H.; HALLER, M. Contribution of cortisol deficiency to septic shock. **Lancet**, 338: 507-508, 1991.
42. BRIGHAM, K.; BOWERS, R.; MCKEEN, C. Methylprednisolone prevention of increased lung vascular permeability following endotoxemia in sheep. **J. Clin. Invest.**, 67: 1103-1110, 1981.
43. BRIGHAM, K.L.; MEYRICK, B. Endotoxin and lung injury. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 133: 913-927, 1986.
44. BRIGHAM, K.; WOOLVERTON, W.; GLAKE, L. Increased sheep lung vascular permeability caused by Pseudomonas bacteremia. **J. Clin. Invest.**, 54: 792-804, 1974.
45. BRIGHTBILL, H.D.; MODLIN, R.L. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. **Immunology**, 101: 1-10, 2000.
46. BRODY, A.R.; SOLER, P.; BASSET, F.; HASCHEK, W.M.; WITSCHI, H. Epithelial-mesenchymal associations of cells in human pulmonary fibrosis and in BHT-oxygen-induced fibrosis in mice. **Exp. Lung Res.**, 2: 207-220, 1981.

47. BROEKELMANN, T.; LIMPER, A.H.; COLBY, T.V. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88: 6642-6646, 1991.
48. BRUN-BUISSON, C.; BROCHARD, L. Corticosteroid therapy in acute respiratory distress syndrome: better late than never? **J. A. M. A.**, 280: 182-183, 1998.
49. BUNNELL, E.; PACTH, E.R. Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 148: 1174-1178, 1993.
50. CATLETT-FALCONE, R.; LANDOWSKY, T.H.; OSHIRO, M.M.; TURKSON, J.; LEVITZKI, A.; SAVINO, R.; CILIBERTO, G.; MOSCINSKI, L.; FERNÁNDEZ-LUNA, J.L.; NUÑEZ, G.; DALTON, W.S.; JOVE, R. Constitutive activation of STAT3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. **Immunity**, 10: 105-115, 1999.
51. CHANG, H.K.; MORTOLA, J.P. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurements. **J. Appl. Physiol.** 51: 218-225, 1981.
52. CHEN, R.H.; CHANG, M.C.; SU, Y.H.; TSAI, Y.T.; KUO, M.L. Interleukin-6 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol transcription 3 pathways. **J. Biol. Chem.**, 274: 2301-2309, 1999.
53. CHEN, C.M.; WANG, L.F.; SU, B.; HSU, H.H. Methylprednisolone effects on oxygenation and histology in a rat model of acute lung injury. **Pulm. Pharmacol. Therap.**, 16: 215-220, 2003.

54. CHESNUTT, A.N.; MATTHAY, M.A.; TIBAYAN, F.A.; CLARK, J.G. Early detection of type III procollagen peptide in acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 156: 840-845, 1997.
55. CHIROUSOS G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. **N. Engl. J. Med.**, 332: 1351-1362, 1995.
56. COCHRAN, B.H.; REFFEL, A.C.; STILES, C.D. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. **Cell**, 33: 939-947, 1983.
57. CONNER, B.D.; BERNARD, G.R. Acute Respiratory Distress Syndrome: Potential pharmacologic interventions. **Clin. Chest Med.**, 21:563-587, 2000.
58. CRANDALL, E.D.; MATTHAY, M.A. Alveolar epithelial transport: Basic science to clinical medicine. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 163: 1021-1029, 2001.
59. CRONIN, L.; COOK, D.J.; CARLET, J.; HEYLAND, D.K.; MATH, D.K.B.; LANSANG, M.A.D.; FISHER, C.J. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta analysis of the literature. **Crit. Care Med.**, 23: 1430-1439, 1995.
60. DADA, L.A.; SZNAJDER, J.I. Mechanics of pulmonary edema clearance during acute hypoxemic respiratory failure: Role of the Na,K-ATPase. **Crit. Care Med.**, 31: S248-S252, 2003.
61. D'ANGELO, E.; CALDERINI, E.; TORRI, G.; ROBATTO, F.M.; BONO, D.; MILIC-EMILI, J. Respiratory mechanics in anesthetized paralyzed humans: effects of flow, volume, and time. **J. Appl. Physiol.**, 67: 2556-2564, 1989.

62. DAS, S.K.; FANBURG, B.L. TGF- β 1 produces a "prooxidant" effect on bovine pulmonary artery endothelial cells in culture. **Am. J. Physiol.**, 262: L249-L254, 1991.
63. DESAI, S.R.; WELLS, A.U.; RUBENS, M.B.; EVANS, T.W.; HANSELL, D.M. Acute respiratory distress syndrome: CT abnormalities at long-term follow up. **Radiology**, 210: 29-35, 1999.
64. DESAI, S.R.; WELSS, A.U.; SUNTHARALINGAN, G.; RUBENS, M.B.; EVANS, T.W.; HANSELL, D.M. Acute Respiratory Distress Syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary injury:a comparative CT study. **Radiology**, 218: 689-693, 2001.
65. DHAINAUT, J.F.; CHARPENTIER, J.; CHICHE, J.D. Transforming growth factor- β : A mediator of cell regulation in acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med.**, 31: S258-S264, 2003.
66. DHAINAUT, J.F.; THEBERT, D.; MARULLO, S. TGF- β 1 levels in BAL fluid correlate with resolution of ARDS. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 159: A377, 1999.
67. DOMENIGHETTI, G.; STRICKER, H.; WALDISPUEHL, B. Nebulized prostacyclin (PGI₂) in acute respiratory distress syndrome: impact of primary (pulmonary injury) and secondary (extrapulmonary injury) disease on gas exchange response. **Crit. Care Med.**, 29: 57-62, 2001.
68. DOYLE, R.L.; SZAFLARSKI, N.; MODIN, G.W.; WIENER-KRONISH, J.P.; MATTHAY, M.A. Identification of patients with acute lung injury: predictors of mortality. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 152: 1818-1824, 1995.

69. FAFFE, D.S.; SILVA, G.H.; KURTZ, P.M.P.; NEGRI, E.M.; CAPELOZZI, V.L.; ROCCO, P.R.M.; ZIN, W.A. Lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a murine model of silicosis. **J. Appl. Physiol.**, 90: 1400-1406, 2001.
70. FERNANDES, A.B.; ZIN, W.A.; ROCCO, P.R.M. Corticosteroids in acute respiratory distress syndrome. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 38: 147-159, 2005.
71. FOWLER, A.A.; HAMMAN, R.F.; GOOD, J.T.; BENSON, K.N.; BAIRD, M.; EBERLE, D.J.; PETTY, T.L.; HYERS, T.M. Adult respiratory distress syndrome: risks with common predispositions. **Ann. Intern. Med.**, 589-593, 1983.
72. FREDBERG, J.J.; STAMENOVIC, D. On the imperfect elasticity of lung tissue. **J. Appl. Physiol.**, 67: 2408-2419, 1989.
73. FREVERT, C.W.; HUANG, S.; DANAE, H.; PAULAUSKIS, J.D.; KOBZIK, L. Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. **J. Immunol.**, 154: 335-344, 1995.
74. FUKUDA, Y.; ISHIZAKI, M.; MASUDA, Y.; KIMURA, G.; KAWANAMI, O.; MASUGI, Y. The role of intra-alveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with DAD. **Am. J. Pathol.**, 126: 171-182, 1987.
75. FUKUDA, Y.; HIBI, M.; YAMANAKA, Y.; TAKAHASHI-TEZUKA, M.; FUJITANI, Y.; YAMAGUCHI, T.; NAKAJIMA, K.; HIRANO, T. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor pg 130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. **Immunity**, 5: 449-460, 1996.

76. FUKUDA, Y.; OHTANI, T.; YOSHIDA, Y.; SHIROGANE, T.; NISHIDA, K.; NAKAJIMA, K.; HIBI, M.; HIRANO, T. STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. **EMBO J.**, 17: 6670-6677, 1998.
77. FULLMER, H.M.; SHEETZ, J.H.; NARKATES, A.J. Oxytalan connective tissue fibers: a review. **J. Oral. Pathol.**, 3: 291-316, 1974.
78. GATTINONI, L.; CAIRONI, P.; PELOSI, P.; GOODMAN, L.R. What has computed tomography taught us about the acute respiratory distress syndrome? **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 164: 1701-1711, 2001.
79. GATTINONI, L.; PELOSI, P.; SUTER, P.M.; PEDOTO, A.; VERCESI, P.; LISSONI, A. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 158: 3-11, 1998.
80. GAULDIE, J.; JORDANA, M.; RICHARDS, C. The release of interferon β 2/BSF2/HSF2/IL-6 by the human lung fibroblast mediates the acute phase response during lung inflammation. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 137: A48, 1988.
81. GIRI, S.N.; HYDE, D.M.; HOLLINGER, M.A. Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. **Thorax**, 48: 959-966, 1993.
82. GOLDIE, R.G.; BERTRAM, J.F.; PAPADIMITRIOU, J.M.; PATERSON, J.W. The lung parenchyma strip. **Trends Pharmacol. Sci.**, 5: 7-9, 1984.
83. GOLDIE, R.G.; PATERSON, J.W.; WALE, J.L. Pharmacological responses of human and porcine lung parenchyma, bronchus and pulmonary artery. **Br. J. Pharmacol.**, 76: 515-521, 1982.

84. GOODMAN, L.R.; FUMAGALLI, R.; TAGLIABUE, P.; TAGLIABUE, M.; FERRARIO, M.; GATTINONNI, L.; PESENTI, A. Adult respiratory distress syndrome due to pulmonary and extrapulmonary causes: CT, clinical, and functional correlation. **Radiology**, 213: 545-552, 1999.
85. GOODMAN, B.R.; STRIETER, R.M.; MARTIN, D.P.; STEINBERG, K.P.; MILBERG, J.A.; MAUNDER, R.J.; KUNKEL, S.L.; WALZ, A.; HUDSON, L.D.; MARTIN, T.R. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 154: 602-611, 1996.
86. GREENE, K.E.; WRIGHT, J.R.; STEINBERG, K.P.; RUZINSKI, J.T.; CALDWELL, E.; WONG, W.B.; HULL, W.; WHITSETT, J.A.; AKINO, T.; KUROKI, Y.; NAGAE, H.; HUDSON, L.D.; MARTIN, T.R. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 160: 1843-1850, 1999.
87. GREGORY, T.J.; LONGMORE, W.J.; MOXLEY, M.A.; WHITSETT, J.A.; REED, C.R.; FOWLER III, A.A.; HUDSON, L.D.; MAUNDER, R.J.; CRIM, C.; HYERS, T.M. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. **J. Clin. Invest.**, 88: 1976-1981, 1991.
88. GROSSMAN, R.F.; JONES, J.G.; AND MURRAY, J.F. Effects of oleic acid-induced pulmonary edema on lung mechanics. **J. Appl. Physiol.**, 48: 1045-1051, 1980.
89. GROUP C.S. The effectiveness of hydrocortisone in the management of severe infection. **J. A. M. A.**, 183: 462-465, 1963.

90. GUNDERSEN, H.J.G.; BENDTSEN, T.F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F.B.; VESTERBY, A.; WEST, M.J. Some new, simple, and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, 96: 379-394, 1988.
91. GUIDOT, D.M.; MODELSKA, K.; LOIS, M. Ethanol ingestion via glutathione depletion impairs alveolar epithelial barrier function in rats. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, 279: L127-L135, 2000.
92. HAGIMOTO, N.; KUWANO, K.; INOSHIMA, I. TGF- β as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. **J. Immunol.**, 168: 6470-6478, 2002.
93. HAMACHER, J.; LUCAS, R.; LIJNEN, H.R. Tumor necrosis factor- α and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 166: 651-656, 2002.
94. HASEGAWA, H.; FUJITA, S. Chemokines and lymphocytes: the role of chemokines and their receptors in the immune system. **Cell Mol. Biol.**, 47: 599-607, 2001.
95. HEFFNER, J.E.; BROWN, L.K.; BARBIERI, C.A.; HARPEL K.S.; DELEO, J. Prospective validation of an acute respiratory distress syndrome predictive score. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 152: 1518-1526, 1995.
96. HERRIDGE, M.S.; CHEUNG, A.M.; TANSEY, C.M. One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. **N. Engl. J. Med.**, 348: 683-693, 2003.

97. HIERHOLZER, C.; HARBRECHT, B.; MENEZES, J.M. Essencial role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. **J. Exp. Med.**, 187: 917-928, 1998.
98. HOELZ, C.; NEGRI, E.M.; LICHTENFELS, A.J.; CONCEIÇÃO, G.M.; BARBAS, C.S.; SALDIVA, P.H., CAPELOZZI, V.L. Morphometric differences in pulmonary lesions in primary and secondary ARDS. A preliminary study in autopsies. **Pathol. Res. Pract.**, 197: 521-530, 2001.
99. HOOPER, R.G.; KEARL, R.A. Established adult respiratory distress syndrome successfully treated with corticosteroids. **South Med. J.**, 89: 359-364, 1996.
100. HURST, V.; GOLDBERG, P.L.; MINNEAR, F.L. Rearrangement of adherens junctions by TGF- β 1: Role of contraction. **Am. J. Physiol.**, 276: L582-L595, 1999.
101. IMANAKA, H.; SHIMAOKA, M.; MATSUURA, N. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF- β 1 mRNA upregulation in rat lung. **Anesth. Analog.**, 92: 428-436, 2001.
102. INGBAR, D.H. Mechanisms of repair and remodeling following acute lung injury. **Clin. Chest Med.**, 21: 589-615, 2000.
103. JANTZ, M.A.; SAHN, S.A. Corticosteroids in acute respiratory failure. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 160: 1079-1100, 1999.
104. KALLENBACH, J.; LEWIS, M.; ZALTMAN, M.; FELDMAN, C.; ORFORD, A.; ZWI, S. "Low-dose" corticosteroid prophylaxis against fat embolism. **J. Trauma**, 27: 1173-1176, 1987.
- 105.

106. KAMINSKI, N.; ALLARD, J.D.; PITTET, J.F. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, 97: 1778-1783, 2000.
107. KAPANCI, Y.; ASSIMACOPOULOS, A.; IRLE, C.; ZWAHLEM, A.; GABBIANI, G. Contractile interstitial cells in pulmonary alveolar septa: a possible regulator of ventilation perfusion ratio. **J. Cell Biol.**, 60: 375-392, 1974.
108. KATZENSTEIN, A.A.; BLOOR, C.M.; LIEBOW, A.A. Diffuse alveolar damage: The role of oxygen, shock and related factors. **Am. J. Pathol.**, 85: 210-222, 1976.
109. KERN, J.A.; LAMB, R.J.; REED, J.C.; DANIELE, R.P.; NOWELL, P.C. Dexamethasone inhibition of interleukin-1 β production by human monocytes. **J. Clin. Invest.**, 81: 237-244, 1988.
110. KHALIL, N.; WHITMAN, D.; ZUO, L.; DANIELPOUR, D.; GREENBERG, A. Regulation of alveolar macrophage transforming growth factor-beta secretion by corticosteroids in bleomycin-induced pulmonary inflammation in the rat. **J. Clin. Invest.** 92: 1812–1818, 1993.
111. KIM, S.J.; OH, B.J.; LEE, J.S.; LIM, C.M.; SHIM, T.S.; LEE, S.D.; KIM, W.S.; KIM, D.S.; KIM, W.D., AND KOH, Y. Recovery from lung injury in survivors of acute respiratory distress syndrome: difference between pulmonary and extrapulmonary subtypes. **Intensive Care Med.**, 30: 1960-1963, 2004.
112. KOCHI, T.; OKUBO, S.; ZIN, W.A.; MILIC-EMILI, J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J. Appl. Physiol.**, 64: 441-450, 1988.

113. KOLLEF, M.H.; SCHUSTER, D.P. The Acute Respiratory Distress Syndrome. **N. Engl. J. Med.**, 332: 27-37, 1995.
114. KURAHASHI, K.; KAJIKAWA, O.; SAWA, T.; OHARA, M.; GROPPER, M.A.; FRANK, D.W.; MARTIN, T.R.; WIENER-KRONISH, J.P. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **J. Clin. Invest.**, 104: 743-750, 1999.
115. LAMBERTS, S.W.J.; BRUINING, H.A.; DE JONG, F. Corticosteroid therapy in severe illness. **N. Engl. J. Med.**, 337: 1285-1292, 1997.
116. LEFERING, R.; NEUGEBAUER, E.A. Steroid controversy in sepsis and septic shock: A metaanalysis. **Crit. Care Med.**, 23: 1294-1303, 1995.
117. LEITE-JUNIOR, J.H.; ROCCO, P.R.M.; FAFPE, D.S.; ROMERO, P.V.; ZIN, W.A. On the preparation for lung tissue mechanics measurement. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, 134: 255-262, 2003.
118. LIEBLER, J.M.; QU, Z.; BUCKNER, B.; POWERS, M.R.; ROSENBAUM, J.T. Fibroproliferation and mast cells in the acute respiratory distress syndrome. **Thorax**, 53: 823-829, 1998.
119. LIM, C.M.; KIM, E.K.; LEE, J.S.; SHIM, T.S.; LEE, S.D.; KOH, Y.; KIM, W.S.; KIM, D.S.; KIM, W.D. Comparison of the response to the prone position between pulmonary and extra-pulmonary acute respiratory distress syndrome. **Intensive Care Med.**, 27: 477-485, 2001.
120. LOETSCHER, P.; CLARK-LEWIS, I. Agonistic and antagonistic activities of chemokines. **J. Leukoc. Biol.**, 69: 881-884, 2001.
121. LOPEZ-AGUILAR, J.; ROMERO, P.V. Effect of elastase pretreatment on rat lung strip induced constriction. **Respir. Physiol.**, 113: 239-246, 1998.

122. LUCE, J.M. Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. **Crit. Care Med.**, 26: 369-376, 1998.
123. LUCE, J.M.; MONTGOMERY, A.B.; MARKS, J.D.; ET AL. Ineffectiveness of high-dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 138: 62-68, 1988.
124. LUDWIG, M.S.; DALLAIRE, M.J. Estructural composition of lung parenchymal strip and mechanical behavior during sinusoidal oscillation. **J. Appl. Physiol.**, 77: 2029-2035, 1994.
125. MACLAREN, R.; JUNG, R. Stress-dose corticosteroid therapy for sepsis and acute lung injury or acute respiratory distress syndrome in critically ill patients. **Pharmacotherapy**, 22: 1140-1156, 2002.
126. MANGIALARDI, R.L.; MARTIN, G.S.; BERNARD, G.R.; WHEELER, A.P.; CHRISTMAN, B.W.; DUPONT, W.D.; HIGGINS, S.B.; SWINDELL, B.B. Hypoproteinemia predicts acute respiratory distress syndrome development, weight gain, and death in patients with sepsis. Ibuprofen in Sepsis Study Group. **Crit Care Med.**, 28: 3137-3145, 2000.
127. MARTIN, T.R. Lung cytokines and ARDS. **Chest**, 116: 2S-8S, 1999.
128. MATTHAY, M.A.; FOLKESSON, H.G.; VERKMAN, A.S. Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. **Am. J. Physiol.**, 270: L487-L503, 1996.
129. MATTHAY, M.A.; LANDOLT, C.C.; STAUB, N.C. Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep. **J. Appl. Physiol.**, 53: 96-104, 1982.

130. MATTHAY, M.A.; WIERNER-KRONISH, J.P. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 142: 1250-1257, 1990.
131. MEAD, J.J.; WHITTENBERGER, L.; RADFORD JR., E.P. Surface tension as a factor in pulmonary volume-pressure hysteresis. **J. Appl. Physiol.**, 10: 191-196, 1957.
132. MEDURI, G.U. The role of the host defense response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiological correlations and response to glucocorticoid treatment. **Eur. Respir. J.**, 9: 2650-2670, 1996.
133. MEDURI, G.U. Host defense response and outcome in ARDS. **Chest**, 112: 1154-1158, 1997.
134. MEDURI, G.U. Levels of evidence for the pharmacologic effectiveness of prolonged methylprednisolone treatment in unresolving ARDS. **Chest**, 116: 116-118, 1999.
135. MEDURI, G.U.; BELENCHIA, J.M.; ESTES, R.J.; WUNDERINK, R.G.; EL TORKEY, M.; LEEPER, K.V. Fibroproliferative phase of ARDS. Clinical findings and the effects of corticosteroids. **Chest**, 100: 943-952, 1991.
136. MEDURI, G.U.; CHINN, A.J.; LEEPER, K.V.; WUNDERINK, R.G.; TOLLEY, E.; WINER-MURAM, H.T.; KHARE, V.; EL TORKI, M. Corticosteroids rescue treatment of progressive fibroproliferation in late ARDS: patterns of response and predictors of outcome. **Chest**, 105: 1516-1527, 1994.
137. MEDURI, G.U.; HEADLEY, S.; GOLDEN, E.; CARSON, S.J.; UMBERGER, R.A.; KELSO, T.; TOLLEY, E.A. Effect of prolonged methylprednisolone

- therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. **J. A. M. A.**, 280: 159-165, 1998a.
138. MEDURI, G.U.; HEADLEY, S.; KOHLER, G.; STENTZ, F.; TOLLEY, E.; UMBERGER, R.; LEEPER, K.V. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 β and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. **Chest**, 107: 1062-1073, 1995a.
139. MEDURI, G.U.; HEADLEY, S.; TOLLEY, E.; SHELBY, M.; STENTZ, F.; POSTLETHWAITE, A. Plasma and BAL cytokine response to corticosteroid rescue treatment in late ARDS. **Chest**, 108: 1315-1325, 1995b.
140. MEDURI, G.U.; TOLLEY, E.A.; CHINN, A.; STENTZ, F.; POSTLETHWAITE, A. Procollagen types I and III aminoterminal propeptide levels during acute respiratory distress syndrome and in response to methylprednisolone treatment. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 158: 1432-1441, 1998b.
141. MEDURI, G.U.; CHROUSOS, G.P. Effectiveness of prolonged glucocorticoid treatment in acute respiratory distress syndrome: The right drug, the right way? **Crit. Care Med.**, 34: 236-238, 2006.
142. MENEZES, S.L.S.; BOZZA, P.T.; CASTRO FARIA NETO, H.C.; LARANGEIRA, A.P.; NEGRI, E.M.; CAPELOZZI, V.L.; ZIN, W.A.; ROCCO, P.R.M. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: Inflammatory and ultrastructural analyses. **J. Appl. Physiol.**, 98: 1777-1783, 2005.
143. MEYRICK, B.O.; BRIGHAM, K.L. Acute effects of Escherichia coli endotoxin on the pulmonary microcirculation of anesthetized sheep structures: function relationships. **Lab. Invest.**, 48: 458-470, 1983.

144. MILLER, E.J.; COHEN, A.B.; NAGAO, S.; GRIFFITH, D.; MAUNDER, R.J.; MARTIN, T.R.; WIENER-KRONISH, J.P.; STIFHERKING, M.; CHRISTOPHERS, E.; MATTHAY, M.A. Elevated level of NAP-1/Interleukin-8 are present in the airspace of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 146: 427-432, 1992.
145. MIJAILOVICH, S.M.; STAMENOVIC, D.; FREDBERG, J.J. Toward a kinetic theory of connective tissue micromechanics. **J. Appl. Physiol.**, 74: 665-681, 1983.
146. MODIG, J.; BORG, T. High dose methylprednisolone in a porcine model of ARDS induced by endotoxemia. **Acta Chir. Scand.**, 526 (Suppl): 94-103, 1985.
147. MONCHI, M.; BELLENFANT, F.; CARIOU, A. ; JOLY, L.M. ; THEBERT, D. ; LAURENT, I.; DHAINAUT, J.F. ; BRUNET, F. Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A multivariate analysis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 158: 1076-1081, 1998.
148. MONTES, G.S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic system. **Cell Biology International**, 20: 15-27, 1996.
149. MONTGOMERY, A.B.; STAGER, M.A.; CARRICO, C.J.; HUDSON, L.D. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 132-148, 1985.
150. MORETTO, A.; DAILLAIRE, E.; ROMERO, P.V.; LUDWIG, M. Effect of elastase on oscillation mechanics of lung parenchymal strips. **J. Appl. Physiol.**, 77: 1623-1629, 1994.

151. MORTOLA, J.P.; NOWORAJ, A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. **J. Appl. Physiol.**, 55: 250-253, 1983.
152. MOSS, M.; MANNINO, D.M. Race and gender differences in acute respiratory distress syndrome (ARDS): An analysis of multiple-cause mortality data (1979-1996). **Crit. Care Med.**, 30: 1679-1685, 2002.
153. MUNGER, J.S.; HUANG, X.; KAWAKATSU, H. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF β -1: A mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. **Cell**, 96: 319-328, 1999.
154. MURRAY, J.F.; MATTHAY, M.A.; LUCE, J.M.; FLICK, M.R. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 138: 720-723, 1988.
155. NEWTON, R.; ADCOCK, I.M.; BARNES, P.J. Stimulation of COX 2 message by cytokines or phorbol ester is preceded by a massive and rapid induction of NF- κ B binding activity. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 151: A165, 1995.
156. NORTHRUP, J.P.; ULLMAN, K.S.; CRABTREE, G.R. Characterization of the nuclear and cytoplasmic components of the lymphoid-specific nuclear factor of activated T cells (NF-AT). **J. Biol. Chem.**, 268: 2917-2923, 1993.
157. O'BRODOVICH, H.; STAUB, O.; ROSSIER, B.C. Ontogeny of alpha 1- and beta 1-isoforms of Na,K-ATPase in fetal distal rat lung epithelium. **Am. J. Physiol.**, 264: C1137-C1143, 1993.
158. PALIOGIANNI, F.; RAPTIS, A.; AHUJA, S.S. ; NAJJAR, S.M. ; BOUMPAS, D.T. Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by

- glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. **J. Clin. Invest.**, 91: 1481-1489, 1993.
159. PARSEY, M.V.; TUDER, R.; ABRAHAM, E. Neutrophils are major contributors to intraparenchymal lung IL-1 β expression after hemorrhage and endotoxemia. *J. Immunol.*, 160: 1007-1013, 1998.
160. PELOSI, P.; CADRINGHER, P.; BOTTINO, N.; PANIGADA, M.; CARRIERI, F.; RIVA, E.; LISSONI, A.; GATTINONNI, L. Sigh in acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 159: 872-880, 1999.
161. PELOSI, P.; D'ONOFRIO, D.; CHIUMELLO, D.; PAOLO, S.; CHIARA, G.; CAPELOZZI, V.L.; BARBAS, C.S.B.; CHIANDARA, M.; AND GATTINONI, L. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different. **Eur. Respir. J.**, 42 (Suppl): 48-56, 2003.
162. PETTY, T.L.; ASHBAUGH, D.G. The adult respiratory distress syndrome: clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. **Chest**, 60: 233-239, 1971.
163. PITCAIRN, M.; SCHULER, J.; ERVE, P.; HOLZMAN, S.; SCHUMER, W. Glucosteroid and antibiotic effect on experimental gram-negative bacteremia shock. **Surgery**, 110: 1012-1015, 1975.
164. PITTET, J.F.; GRIFFITHS, M.J.D.; GEISER, T. TGF- β is a critical mediator of acute lung injury. **J. Clin. Invest.**, 107: 1537-1544, 2001.
165. PITTET, J.F.; MACKERSIE, R.C.; MARTIN, T.R.; MATTHAY, M.A Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 155: 1187-1205, 1997.

166. PUGIN, J.; VERGHESE, G.; WIDMER, M.C.; MATTHAY, M.A. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. **Crit. Care Med.**, 27: 304-312, 1999.
167. QUINTEL, M.; PELOSI, P.; CAIRONI, P.; MEIHARDT, J.P.; LUECKE, T.; HERMAN, P.; TACCONE, P.; RYLANDER, C.; VALENZA, F.; CARLESSO, E.; AND GATTINONI, L. An increase of abdominal pressure increases pulmonary edema in oleic acid-induced lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 169: 534-541, 2004.
168. RAGHU, G.; STRIKER, L.J.; HUDSON, L.D.; AND STRIKER, G.E. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 131: 281-289, 1985.
169. RAO, R.K.; LI, L.; BAKER, R.D. Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. **Am. J. Physiol.**, 279: G332-G340, 2000.
170. RAZ, R.; LEE, C.K.; CANNIZZARO, S.A.; D'EUSTACHIO, P.; LEVY, D.E. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. **Proc. Natn. Acad. Sci. USA**, 96: 2846-2851, 1999.
171. RE, F.; MUZIO, M.; DE ROSSI, M.; POLENTARUTTI, N.; GIRL, J.G.; MANTOVANI, A.; COLOTTA, F. The type II receptor as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. **J. Exp. Med.**, 179: 739-743, 1994.

172. RHEN, T.; CIDLOWSKI, A. Antiinflammatory action of glucocorticoids: New mechanisms for old drugs. **N. Engl. J. Med.**, 353: 1711-1723, 2005.
173. RIALP, G.; BETBESÉ, A.J.; PÉREZ-MÁRQUEZ, M.; MANCEBO, J. Short-term effects of inhaled nitric oxide and prone position in pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 164: 243-249, 2001.
174. RIDGE, K.M.; OLIVERA, W.; SALDIAS, F. Localization and role of Na,K-ATPase α 2 isoform in rat alveolar epithelium. **Circ. Res.**, 92: 453-460, 2003.
175. ROCCO, P.R.M.; NEGRI, E.M.; KURTZ, P.M.; VASCONCELLOS, F.P.; SILVA, G.H.; CAPELOZZI, V.L.; ROMERO, P.V.; ZIN, W.A. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 164: 1067-1071, 2001.
176. ROCCO, P.R.M.; SOUZA, A.B.; FAFFE, D.S.; PASSARO, C.P.; SANTOS, F.B.; NEGRI, E.M.; LIMA, J.G.M.; CONTADOR, R.S.; CAPELOZZI, V.L., AND ZIN, W.A. Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 168: 677-684, 2003.
177. ROCCO, P.R.M.; FACCHINETTI, L.D.; FERREIRA, H.C.; NEGRI, E.M.; CAPELOZZI, V.L.; FAFFE, D.S.; AND ZIN, W.A. Time course of respiratory mechanics and pulmonary structural remodeling in acute lung injury. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, 143: 49-61, 2004.
178. ROCCO, P.R.M., ZIN, W.A. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different? **Curr. Opin. Crit. Care**, 11: 10-17, 2005.

179. ROMERO, P.V.; RODRIGUES, B.; LOPEZ-AGUILAR, J.; MANRESA, F. Parallel airways inhomogeneity and lung tissue mechanics in transition to constricted state in rabbits. **J. Appl. Physiol.**, 84: 1040-1047, 1998.
180. ROMERO, P.V.; ZIN, W.A.; LOPEZ-AGUILAR, J. Frequency characteristics of lung tissue strip during passive stretch and induced pneumoconstriction. **J. Appl. Physiol.**, 91: 882-890, 2001.
181. ROOK, A.H.; KEHRL, J.H.; WAKEFIELD, L.M. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: Depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. **J. Immunol.**, 136: 3916-3920, 1986.
182. ROUBY, J.J.; PUYBASSET, L.; CLUZEL, P.; RICHEOCOEUR, J.; LU, Q.; GRENIER, P. Regional distribution of gas and tissue in acute respiratory distress syndrome. **Intensive Care Med.**, 26: 1046-1056, 2000.
183. RUTSCHMAN, D.H.; OLIVERA, W.; SZNAJDER, J.I. Active transport and passive liquid movement in isolated perfused rat lungs. **J. Appl. Physiol.**, 75: 1574-1580, 1993.
184. SALDIVA, P.H.N.; ZIN, W.A.; SANTOS, R.L.B.; EIDELMAN, D.H.; MILIC-EMILI, J. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. **J. Appl. Physiol.**, 72: 302-306, 1992.
185. SALERNO, F.G.; DALLAIRE, M.; LUDWIG, M.S. Does the anatomic makeup of parenchymal lung strip affect oscillatory mechanics during induced constriction? **J. Appl. Physiol.**, 79: 66-72, 1995.

186. SALERNO, F.G.; PARE, P.; LUDWIG, M.S. A comparative study of elastic properties of rat and guinea pig parenchymal strips. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 157: 846-852, 1998.
187. SANTOS, F.B.; NAGATO, L.K.S.; BOECHEM, N.M.; NEGRI, E.M.; GUIMARÃES, A.; CAPELOZZI, V.L.; FAFFE, D.S.; ZIN, W.A.; ROCCO, P.R.M. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. **J. Appl. Physiol.**, 100: 98-106, 2006.
188. SCHEEREN, T.; RADERMACHER, P. Prostacycline (PGI₂): New aspects of an old substance in the treatment of critically ill patients. **Intensive Care Med.**, 23: 146-158, 1996.
189. SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, 26: 57-60, 1970.
190. SCHUMER, W. Steroids in the treatment of clinical septic shock. **Ann. Surg.**, 184: 333-341, 1976.
191. SENFTLEBEN, U.; KARIN, M. The IKK/NF- κ B pathway. **Crit. Care Med.**, 30: S18-S26, 2002.
192. SHAW, G.; KAMEN, R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. **Cell**, 46: 659-667, 1986.
193. SHENKAR, R. ; ABRAHAM, E. Mechanisms of lung neutrophil activation after hemorrhage or endotoxemia: Roles of reactive oxygen intermediates, NF- κ B, and cyclic AMP response element binding protein. **J. Immunol.**, 163: 954-962, 1999.

194. SHENKAR, R.; COULSON, W.F.; ABRAHAM, E. Anti-TGF- β monoclonal antibodies prevent lung injury in hemorrhaged mice. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 11: 351-357, 1994.
195. SHULL, M.M.; ORMSBY, L.; KIER, A.B.; Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. **Nature**, 359: 693-699, 1992.
196. SMALDONE, G.C.; MITZNER, W.; ITOH, H. Role of alveolar recruitment in lung inflation: influence on pressure-volume hysteresis. **J. Appl. Physiol.**, 55: 1321-1332, 1983.
197. SNYDER, L.S.; HERTZ, M.I.; HARMON, K.R.; BITTERMAN, P.B. Failure of lung repair following acute lung injury: regulation of the fibroproliferative response. **Chest**, 98: 733-738, 1990.
198. SPRUNG, C.; CARALIS, P.; MARCIAL, E, ET AL. The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock: a prospective, controlled study. **N. Engl. J. Med.**, 311: 1137-1143, 1984.
199. STREETZ, K.L.; WÜSTEFELD, T.; KLEIN, C.; MANNS, M.; TRAUTWEIN, C. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. **Cell Mol. Biol.**, 47: 661-673, 2001.
200. SUGIYAMA, K.; KAWAI, T. Diffuse alveolar damage and acute interstitial pneumonitis: Histochemical evaluation with lectins and monoclonal antibodies against surfactant apoprotein and collagen type IV. **Mod. Pathol.**, 6: 242-248, 1993.
201. SUNTHARALINGAM, G.; REGAN, K.; HEOGH, B.F.; MORGAN, C.J.; EVANS, T.W. Influence of direct and indirect etiology on acute outcome and 6-

- month functional recovery in acute respiratory distress syndrome. **Crit. Care Med.**, 29: 562-566, 2001.
202. SUTTON, A.B.; CANFIELD, A.E.; SHOR, S.L. The response of endothelial cells to TGF β -1 is dependent upon cell shape, proliferative state and the nature of the substratum. **J. Cell Sci.**, 99: 777-787, 1991.
203. SWAN, H.J.C.; GANZ, W.; FORRESTER, J.S.; MARCUS, H.; DIAMOND, G.; CHONETTE, D. Catheterization of the heart in man with use of a flow-directed ballon-tipped catheter. **N. Engl. J. Med.**, 283: 447-451, 1970.
204. SZNAJDER, J.I. Strategies to increase alveolar epithelial fluid removal in the injured lung. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 160: 1441-1442, 1999.
205. SZNAJDER, J.I. Alveolar edema must be cleared for the acute respiratory distress syndrome patient to survive. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 163: 1293-1294, 2001.
206. TAKEDA, K.; KAISHO, T.; YOSHIDA, N.; TAKEDA, J.; KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. STAT3 activation is responsible for IL-6 dependent T-cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T-cell-specific STAT3-deficient mice. **J. Immunol.**, 161: 4652-4660, 1998.
207. TEPLITZ, C. The core pathobiology and integrated medical science of adult acute respiratory insufficiency. **Surg. Clin. North**, 56: 1091-1133, 1976.
208. TERADA, L.S.; DORMISH, J.J.; SHANLEY, P.F. Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. **Am. J. Physiol.**, 263: L394-L401, 1992.

209. THOMPSON, A.G.; STARZL, T.C. New immunosuppressive drugs: mechanistic insights and potential therapeutic advances. **Immunol. Rev.**, 136: 71-98, 1993.
210. THOMPSON, B.T. Glucocorticoids and acute lung injury. **Crit. Care Med.**, 31: S253-S257, 2003.
211. TOMASHEFSKI JR., J.F. Pulmonary Pathology of Acute Respiratory Distress Syndrome. **Clin. Chest Med.**, 21: 435-466, 2000.
212. TOUNG, T.; BORDOS, D.; BENSON, D.; CARTER, D.; ZUIDEMA, G.D.; PERMUTT, S.; CAMERON, J.L. Aspiration pneumonia: experimental evaluation of albumin and steroid therapy. **Ann. Surg.**, 183: 179-184, 1976.
213. TSUNAWAKI, S.; SPORN, M.; NATHAN, C. Deactivation of macrophages by TGF- β . **Nature**, 334: 260, 1988.
214. ULICH, T.R.; YIN, S.; GUO, K.; YI, E.S.; REMICK, D.; DEL CASTILHO, J. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. **Am. J. Pathol.**, 138: 1097-1101, 1991.
215. VAN DE STOLPE, A.; CALDENHOVEN, E.; RAAIJMAKERS, J.A.M.; VAN DER SAAG, P.T.; KOENDERMAN, L. Glucocorticoid-mediated repression of intercellular adhesion molecule-1 expression in human monocytes and bronchial epithelial cell lines. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 8: 340-347, 1993.
216. VETERANS ADMINISTRATION SYSTEMS SEPSIS COOPERATIVE STUDY GROUP. Effect of high-dose glucocorticoid therapy on mortality in patients with clinical signs of systemic sepsis. **N. Engl. J. Med.**, 317: 659-665, 1987.

217. VITTORI, E.; MARINI, M.; FASOLI, A. Increased expression of endothelium in bronchial epithelial cells of asthmatic patients and effect of corticosteroids. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 146: 1320-1325, 1992.
218. XISTO, D.G.; FARIAS, L.L.; FERREIRA, H.C.; PICANCO, M.R.; AMITRANO, D.; LAPA E SILVA, J.R.; NEGRI, E.M.; MAUAD, T.; CARNIELLI, D.; SILVA, L.F.; CAPELOZZI, V.L.; FAFFE, D.S.; ZIN, W.A.; ROCCO, P.R.M. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 171: 829-837, 2005.
219. WAHL, S.M. TGF- β in inflammation: A cause and a cure. **J. Clin. Immunol.**, 12: 61-74, 1992.
220. WAHL, S.M.; ALLEN, J.B.; WEEKS, B.S. TGF- β enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 117: 13, 1993.
221. WAHL, S.M.; HUNT, D.A.; WONG, H.L. TGF- β is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1 dependent lymphocyte proliferation. **J. Immunol.**, 140: 3026, 1988.
222. WALMRATH, D.; SCHNEIDER, T.; SCHERMULY, R.; OLSCHIEWSKI, H.; GRIMMINGER, F.; SEEGER, W. Direct comparison of inhaled nitric oxide and aerosolized prostacyclin in acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 153: 991-996, 1996.
223. WARE, L.B.; MATTHAY, M.A. The acute respiratory distress syndrome. **New Engl. J. Med.**, 342: 1334-1349, 2000.
224. WARE, L.B.; MATTHAY, M.A. Measuring microvascular blood flow in sepsis: A continuing challenge. **Lancet**, 360: 1187-1188, 2002.

225. WEIGELT, J.A.; NORCROSS, J.F.; BORMAN, K.R.; SNYDER, W.H. Early steroid therapy for respiratory failure. **Arch. Surg.**, 120: 536-540, 1985.
226. WEIGERT, C. Über eine methode zur farbung elastischer fasern. **Zentralbl. Allg. Pathol. Anat.**, 9: 289-292, 1898.
227. WEIL, M.H.; HENNING, R.J.; MORISSETTE, M.; MICHAELS, S. Relationship between colloid osmotic pressure and pulmonary artery wedge pressure in patients with acute cardiorrespiratory failure. **Am. J. Med.**, 64: 643-650, 1978.
228. WIENER-KRONISH, J.P.; ALBERTINE, K.H.; MATTHAY, M.A. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. **J. Clin. Invest.**, 88: 864-875, 1991.
229. WINER-MURAN, H.T.; STEINER, R.M.; GURNEY, J.W.; et al. Ventilator-associated pneumonia in patients with adult respiratory syndrome: CT evaluation. **Radiology**, 208: 193-199, 1998.
230. XIE, Q.W.; KASHIWARBARA, Y., NATHAN, C. Role of transcription factor NF- α B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, 269: 4705-4708, 1994.
231. YANG-YEN, H.F.; CHAMBARD, J.C. ; SUN, Y.L.; SMEAL, T.; SCHMIDT, T.J.; DROUIN, J.; KARIN, M. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. **Cell**, 62: 1205-1215, 1990.
232. YUAN, H.; KONONOV, S.; CAVALCANTE, F.S.A.; LUTCHEN, K.R.; INGENITO, E.P.; SUKI, B. Effects of collagenase and elastase on the mechanical properties of lung tissue strips. **J. Appl. Physiol.**, 89: 3-14, 2000.

233. ZILBERBERG, M.D.; EPSTEIN, S.K. Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 157: 1159-1164, 1998.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)