FLAVIA BRANDÃO DOS SANTOS

Análise temporal do remodelamento do parênquima pulmonar na lesão pulmonar aguda de origem direta e indireta.

Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do Grau de Doutor em Ciências: Fisiologia.

Orientador: Walter Araújo Zin



Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho Universidade Federal do Rio de Janeiro Agosto 2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Santos, Flavia Brandão dos

Análise temporal do remodelamento do parênquima pulmonar na lesão pulmonar aguda de origem direta e indireta

xviii, 153 f.

Orientador: Walter Araujo Zin

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Programa de Ciências Biológicas – Fisiologia – 2007

Referências Bibliográficas: f. 109-132

1. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo 2. Mecânica Respiratória 3. Elastância 4. Remodelamento Parênquima Pulmonar 5. Matriz Extracelular 6. Camundongo.

I. Zin, Walter Araújo. II Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Ciências Biológicas, Fisiologia. III.Título.

FLAVIA BRANDÃO DOS SANTOS

Análise temporal do remodelamento do parênquima pulmonar na lesão pulmonar aguda de origem direta e indireta

Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do Grau de Doutor em Ciências: Fisiologia.

Data: 27/08/2007

APROVADA POR:

Prof^a. Débora Souza Faffe Prof^a. Adjunta UFRJ

Prof^a. Fátima Carneiro Fernandes Prof^a. Adjunta UFRJ

Prof^a. Jennifer Lowe Prof^a. Adjunta UFRJ

Prof. Walter Araújo Zin (Orientador) Prof. Titular UFRJ

Prof^a. Patricia Rieken Macêdo Rocco (Revisor) Prof^a. Adjunta UFRJ

Rio de Janeiro, Brasil.

Agosto 2007

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de 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 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-MCT, PRONEX-FAPERJ).

"... deve-se ser modesto perante a complexidade e a inteligência que governam o corpo humano. Seja qual for o valor de nosso trabalho não mais fazemos do que tentar compreender um pouco melhor um ser que, desde há milênios, funciona independentemente do nosso conhecimento". Léopold Busquet A Deus, pelo dom da vida, pela

paz e esperança edificadas na fé.

Ao meu pai, Paulino, exemplo de serenidade e coragem. Seus ensinamentos me fortalecem e me fazem seguir adiante.

À minha mãe, Glória, pelas palavras incessantes de otimismo, força e consolo quando tudo parece impossível. Mãe: sem você não me imagino!

> À minha irmã, Natália, pelo sorriso certo na hora certa e na medida perfeita.

AGRADECIMENTOS

Durante os anos de elaboração deste trabalho e do caminho até aqui percorrido, algumas pessoas foram fundamentais, tanto para a elaboração desta tese quanto pela significativa presença neste período da minha vida e que contribuíram na minha evolução pessoal:

- Profº. Walter Zin, por sua competência e brilhantismo, orientação e atenção a mim dispensada em toda a minha vida acadêmica. Pelo exemplo de pesquisador, ensinando a importância da seriedade e da responsabilidade na área da pesquisa. Pela incansável dedicação durante a elaboração desta tese. Certamente, tudo ficou melhor após as suas contribuições. Segue, nas próximas páginas, o resultado das horas de trabalho. Muito Obrigada!
- Prof^a. Patricia Rocco, por sua competência. Obrigada pela disponibilidade e atenção que possibilitaram esse meu caminho. Agradeço ainda pela cuidadosa e criteriosa revisão desta tese.
- Prof^a Débora Faffe por todas as suas contribuições durante o período de convivência neste laboratório.
- Profas. Vera Capellozi e Elnara Negri pela realização da análise histológica desse estudo.
- Minha grande amiga Lilian Katiê, amiga de todas as horas, sempre presente em cada etapa deste trabalho e de todos os momentos da vida desde que nos conhecemos.
 Certamente tudo foi mais fácil e divertido com você.
- Meus amigos Gabriela Guerra, Bianca Ribas, Cristiane Pires, Paola Enhan, Nara Leal, Lívia Facchinetti e André Favre: com certeza eu não teria conseguido trilhar esse caminho se não fosse pela amizade e confiança de vocês. É muito reconfortante tê-los como amigos.

- Todas as pessoas da minha família que sempre acreditaram no meu trabalho e compreenderam os momentos de dedicação a este estudo.
- Aos demais amigos aqui não citados, seriam muitos... sigo certa da importância que cada um desempenha na minha existência.
- No laboratório existem ainda muitas pessoas que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e outros tantos que somente pela convivência me ensinaram a ser uma pessoa melhor e fizeram o dia-a-dia no laboratório mais feliz. A todas elas devo meu profundo e sincero agradecimento:
 - Rafael Cadete, pelos momentos de alegria proporcionados durante as horas de trabalho, pela certeza de que tudo acaba bem no final e pelo exemplo de tranqüilidade nos momentos difíceis.
 - Halina Cidrini, grande amiga e conselheira. Obrigada pelas longas conversas dentro e fora das atividades do laboratório e por tantas outras que estão por vir.
 - Alba Fernandes, Caroline Pássaro, Cristina Dias, Débora Xisto, Cristiane Nascimento, Mariana Genuíno, José Henrique, Elizabeth D'Alessandro, Renata Contador: sempre prontos a me ajudar em todos os momentos, cada um com a sua característica peculiar. Obrigada pela longa jornada que percorremos juntos, momentos muito alegres que jamais esquecerei. Cada um tem um espaço na minha memória e no meu coração.
 - Aos mais recentes amigos, não menos importantes: Flavia Mazzoli, Viviane Cagido, Giovanna Cavalcante, Douglas Riva, Silviane Fernandes e aos demais alunos do laboratório, que de alguma forma estiveram presentes durante todos estes anos. Fico feliz por ter conhecido vocês!

RESUMO

SANTOS, Flavia Brandão dos. Análise temporal do remodelamento do parênquima pulmonar na lesão pulmonar aguda de origem direta e indireta. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Esse estudo avaliou a evolução temporal do remodelamento do parêquima pulmonar em um modelo murino de Lesão Pulmonar Aguda (LPA) pulmonar (p) e extra-pulmonar (exp) com alterações funcionais semelhantes. Para tal, mecânica respiratória (pressões resistiva, viscoelástica e elastância pulmonar), histologia (microscopia óptica e eletrônica), conteúdo de fibras colágenas e elásticas no septo alveolar e a expressão de metaloproteinases (MMP-9) foram avaliados 24 horas, 1, 3 e 8 semanas após a indução da lesão. Nos grupos Cp e Cexp salina (0,9% NaCl) foi instilada intra-traquealmente (i.t., 0,05 ml) e injetada intra-peritonealmente (i.p. 0,5 ml). Nos grupos ALIp e ALIexp os camundongos receberam lipopolissacarídeo de Escherichia coli (10 µg, i.t. e 125 µg i.p., respectivamente). Todos os parâmetros mecânicos e morfométricos, assim como o conteúdo de fibras colágenas tipo III aumentaram similarmente em 24h nos grupos ALIp e ALlexp. Em ALlexp, todos os parâmetros mecânicos e histológicos retornaram a valores semelhantes aos do grupo controle (Cexp) em uma semana. Entretanto, em ALIp os valores de elastância estática permaneceram aumentados até a terceira semana de lesão; enquanto os valores de pressões resistiva e viscoelástica pulmonares, bem como conteúdo de fibras colágenas tipo III e fibras elásticas mantiveram-se elevados até a oitava semana de lesão. ALIp evidenciou maior expressão de MMP-9 por células (macrófagos e neutrófilos) guando comparado a ALlexp.

Concluindo, a lesão pulmonar de etiologia direta ao parênquima pulmonar apresentou fibroelastogênese, enquanto a lesão pulmonar de origem extrapulmonar desenvolveu apenas fibrose apresentando reparo precoce durante o curso da lesão. Dessa forma, alterações funcionais e morfológicas precoces não predizem o comportamento do remodelamento do parênquima pulmonar.

Palavras-chave: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo; Mecânica Pulmonar;

Elastância; Remodelamento Parênquima Pulmonar; Matriz Extracelular; Camundongo.

ABSTRACT

SANTOS, Flavia Brandão dos. **Time course of parenchyma remodeling in pulmonary and extrapumlonary acute lung injury induced by** *Escherichia coli* **lipopolysaccharide**. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

The aim of this study was to analyze the time course of lung parenchyma remodeling in a murine model of pulmonary (p) and extra-pulmonary (exp) acute lung injury (ALI) with similar functional changes. For this purpose, lung mechanical parameters (lung resistive and viscoelastic pressures, and static elastance), histology (light and electron microscopy), the amount of elastic and collagen fibers in the alveolar septa, and the expression of matrix metalloproteinase (MMP-9) were analyzed 24 hours, 1, 3, and 8 weeks after the induction of lung injury. In Cp and Cexp groups, saline was intratracheally (i.t., 0.05 ml) instilled and intraperitoneally (i.p., 0.5 ml) injected. In ALIp and ALIexp groups, mice received E. coli lipopolysaccharide (10 µg, i.t. and 125 µg, i.p., respectively). All mechanical and morphometrical parameters, as well as type III collagen fiber content increased similarly at 24 h in ALIp and ALIexp groups. In ALlexp, all mechanical and histological data returned to control values at 1 week. However, in ALIp static elastance returned to control values at 3 weeks, while resistive and viscoelastic pressures, as well as type III collagen fibers and elastin remained elevated until the 8th week. ALIp showed more cells (macrophages and neutrophils) expressing MMP-9 than ALlexp. In conclusion, pulmonary ALI showed persistent fibroelastogenesis, while mice with extrapulmonary ALI developed only fibrosis that was repaired early in the course of lung injury. In addition, early functional and morphological changes did not predict the behavior of lung parenchyma remodeling.

Keywords: Acute Respiratory Distress Syndrome; Lung Mechanics; Elastance; Lung Parenchyma Remodeling; Extracelullar Matrix; Mice.

LISTA DE SIGLAS

- ALI Acute lung injury
- AQP Aquaporina
- BALF Fluido do lavado broncoalveolar
- CL Complacência do pulmão
- Csp Complacência específica
- Crs Complacência do sistema respiratório
- CRF Capacidade residual funcional
- Cw Complacência da parede torácica
- DAD Dano alveolar difuso
- E2 Elastância do componente viscoelástico (corpo de Maxwell)
- Edyn, L Elastância dinâmica do pulmão
- EGF Fator de crescimento epidermal
- Ers Elastância estática do sistema respiratório
- Est, L Elastância estática do pulmão
- Ew Elastância estática da parede torácica
- FGF Família de fatores de crescimento
- FiO₂ Fração inspirada de oxigênio
- GAG Glicosaminoglicano
- HGF Fator de crescimento para hepatócito
- IL Interleucina
- $INF\gamma$ Interferon gama
- KGF Fator de crescimento para queratinócito
- LPA Lesão pulmonar aguda
- LPIV Lesão pulmonar induzida pelo ventilador
- LPS Lipopolissacarídeo
- MEC Matriz extracelular

- MMP Metaloproteinase
- PaO₂ Pressão parcial arterial de oxigênio
- PDGF Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PEEP Pressão positiva ao final da expiração
- Pel Pressão de retração elástica do pulmão
- Pi Pressão pulmonar no ponto de inflexão
- PI e PII Pneumócitos tipos I e II
- PL Pressão transpulmonar
- Pmáx Pressão máxima, ou de pico, inspiratória
- Ptr Pressão traqueal
- R Resistência total
- Raw Resistência das vias aéreas
- Rtis Resistência tecidual
- SDRA Síndrome do desconforto respiratório agudo
- TGF- β Fator transformador de crescimento β
- T_I Tempo inspiratório
- TIMP Inibidor tecidual das metaloproteinases
- TNF β Fator de necrose tumoral β
- TNF- α Fator de necrose tumoral α
- VEGF Fator de crescimento endotelial vascular
- V_T Volume corrente
- V Fluxo

LISTA DAS ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da fase aguda da Síndrome do Desconforto		
Respiratório Agudo	007	
Figura 2. Modelo unicompartimental	030	
Figura 3. Modelo do método de oclusão ao final da inspiração	031	
Figura 4. Modelo de molas e amortecedores		
Figura 5. Montagem experimental para medida da mecânica respiratória		
Figura 6. Traçados de fluxo, volume e pressão transpulmonar obtidos a partir do		
método de oclusão da via aérea ao final da inspiração	049	
Figura 7. Retículo para quantificação morfométrica		
Figura 8. Gráficos de variação de pressão	060	
Figura 9. Gráficos de variação de elastância	061	
Figura 10. Fotomicrografia de parênquima pulmonar – edema perivascular	063	
Figura 11. Fotomicrografia de parênquima pulmonar – vias aéreas		
Figura 12. Fotomicrografia de parênquima pulmonar dos grupos Cp e ALIp		
Figura 13. Fotomicrografia de parênquima pulmonar dos grupos Cexp e ALlexp		
	066	
Figura 14. Gráfico do conteúdo de fibras colágenas	073	
Figura 15. Fotomicrografia de parênquima pulmonar – Fibras colágenas grupos		
Cp e ALIp	074	
Figura 16. Fotomicrografia de parênquima pulmonar – Fibras colágenas grupos		
Cexp e ALlexp	075	
Figura 17. Gráfico do conteúdo de fibras elásticas		

Figura 18. Fotomicrografia de parênquima pulmonar – Fibras elásticas grupos	
Cp e ALIp	077
Figura 19. Fotomicrografia de parênquima pulmonar – Fibras elásticas grupos	
Cexp e ALlexp	078
Figura 20. Microscopia eletrônica de parênquima pulmonar do grupo Cp	080
Figura 21. Microscopia eletrônica de parênquima pulmonar do grupo ALIp24	081
Figura 22. Microscopia eletrônica de parênquima pulmonar do grupo ALIp1	082
Figura 23. Microscopia eletrônica de parênquima pulmonar do grupo ALIp3	083
Figura 24. Microscopia eletrônica de parênquima pulmonar do grupo ALIp8	084
Figura 25. Microscopia eletrônica de parênquima pulmonar do grupo Cexp	085
Figura 26. Microscopia eletrônica de parênquima pulmonar do grupo ALIexp24	086
Figura 27. Microscopia eletrônica de parênquima pulmonar do grupo ALIexp1 .	087
Figura 28. Microscopia eletrônica de parênquima pulmonar do grupo ALIexp3 .	088
Figura 29. Microscopia eletrônica de parênquima pulmonar do grupo ALIexp8 .	089
Figura 30. Gráfico de expressão de metaloproteinases	091

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1. Critérios clínicos para definição de LPA e SDRA	003
Tabela 2. Estratificação da SDRA	004
Tabela 3. Família das metaloproteinases	016
Tabela 4. Parâmetros de mecânica respiratória	059
Tabela 5. Celularidade do parênquima pulmonar	070
Tabela 6. Morfometria pulmonar	071
Tabela 7. Conteúdo de fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar	072
Tabela 8. Correlação entre achados morfométricos e mecânicos	92

SUMÁRIO

Ficha Catalográfica	ii
Agências Financiadoras	iv
Dedicatórias	vi
Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	х
Lista de Siglas	xi
Lista das Ilustrações	xiii
Lista das Tabelas	xv
Sumário	xvi
1 Introdução	001
1.1. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo Pulmonar e Extra-pulmonar -	
Diferentes Síndromes?	002
1.2. Patogênese da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo de origem direta	
e indireta	004
1.3. Organização da matriz extracelular e remodelamento do tecido pulmonar na	
SDRA	007
1.3.1. Fibras colágenas	008
1.3.2. Fibras elásticas	010
1.3.3. Glicoproteínas e integrinas	011
1.3.4. Proteoglicanos e glicosaminoglicanos	012
1.3.5. Metaloproteinases	014

1.4. Mecanismos de remodelamento	017		
1.5. Modelo de SDRA mediada por lipopolissacarídeo			
1.6. Mecânica respiratória	024		
1.6.1. Noções básicas	024		
1.6.2. Estudo da mecânica respiratória	028		
2. Justificativa	036		
3. Objetivos	040		
4. Materiais e Métodos	042		
4.1. Grupos experimentais	043		
4.2. Mecânica respiratória	044		
4.2.1. Método de oclusão ao final da inspiração	048		
4.3. Remoção dos pulmões e análise histopatológica	051		
4.4. Microscopia eletrônica de transmissão	053		
4.5. Quantificação das metaloproteinases	055		
4.6. Análise estatística	055		
5. Resultados	057		
5.1. Mecânica respiratória	058		
5.2. Análise histopatológica e morfométrica	062		
5.2.1. Análise qualitativa	062		
5.2.2. Análise quantitativa	067		
5.3. Microscopia eletrônica	079		
5.4. Quantificação de metaloproteinases	090		
5.5. Correlação entre os achados mecânicos e morfométricos			
6. Discussão	093		

6.1. Modelo experimental	095
6.2. Mecânica respiratória e histologia pulmonar	097
6.3. Remodelamento da matriz extracelular	101
6.4. Conclusões	107
7. Referências bibliográficas	110
8. Apêndice	136

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo Pulmonar e Extra-pulmonar – Diferentes Síndromes?

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é a forma mais grave de lesão pulmonar aguda, constituindo um sério problema mundial em medicina intensiva, afetando tanto pacientes clínicos quanto cirúrgicos. É uma doença de etiologia multifatorial, causada por uma agressão direta ou indireta ao pulmão (Ware & Matthay, 2000; Ware, 2005; Wheeler & Bernard 2007).

Sua primeira descrição clínica foi realizada por Ashbaugh e colaboradores (Ashbaugh e cols., 1967) ao identificarem pacientes ventilados mecanicamente que evoluíam com dispnéia grave, taquipnéia, cianose refratária à oxigenoterapia, diminuição da complacência pulmonar e evidência de infiltrados difusos na radiografia de tórax.

Desde sua primeira descrição, os critérios para definição da SDRA vêm sofrendo modificações, a fim de corrigir possíveis falhas na definição inicial e, desta forma, criar critérios mais específicos para identificar pacientes com SDRA (Murray e cols., 1988).

O consenso aceito atualmente (Bernard e cols., 1994), estabelecido em uma Conferência entre as Sociedades Americana e Européia de Terapia Intensiva, define a 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 oxigenoterapia. Clinicamente, ocorrerá dispnéia de início súbito acompanhada de infiltrado difuso à radiografia de tórax e hipoxemia grave à gasometria arterial. Define-se, então, Lesão Pulmonar Aguda (LPA) quando a relação entre a pressão parcial arterial de oxigênio (PaO₂) e a fração inspirada de oxigênio (FiO₂) — PaO₂/FiO₂ – for menor ou igual a 300, e SDRA quando menor ou igual a 200. A atual definição do consenso Norte-Americano e Europeu sofre algumas críticas, apontando para a necessidade da aplicação de alguns métodos adicionais para a classificação dos pacientes com LPA, como a medida da complacência pulmonar (Matthay, 1999) (Tabela 1).

	Instalação	Oxigenação	RX Tórax	Pressão capilar pulmonar
LPA	Aguda	PaO₂/FiO₂ <u>≤</u> 300	Infiltrados bilaterais	<u><</u> 18 mmHg
SDRA	Aguda	$PaO_{2}/FiO_{2} < 200$	Infiltrados bilaterais	< 18 mmHa

Tabela 1 – Critérios clínicos para definição de LPA e SDRA:

LPA: lesão pulmonar aguda. SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo. PaO₂: pressão parcial de oxigênio. FiO₂: Fração inspirada de oxigênio.

Os fatores de risco para SDRA foram estudados por vários autores (Fowler e cols., 1983), sendo, então, separados pelo consenso de 1994 (Bernard e cols., 1994) em dois grupos: lesão inicial direta ou pulmonar ou primária, com comprometimento primário da integridade do epitélio das vias respiratórias, e indireta ou extrapulmonar ou secundária, quando o endotélio vascular é o sítio inicial de lesão. Pneumonias, aspiração de conteúdo gástrico, contusão pulmonar, embolia gordurosa, afogamento e inalação de gases tóxicos constituem os principais fatores de risco para LPA direta. Entre as causas indiretas, destacam-se: sepse, trauma grave não torácico e pancreatite aguda (Kollef e cols., 1995). Atualmente, adota-se a distinção entre SDRA pulmonar e SDRA extra-pulmonar, entendendo-se que estas constituem síndromes distintas, que, por conseqüência, são passíveis de diferentes formas de intervenção terapêutica (Gattinoni e cols., 1998; Pelosi e cols., 1999b; Callister e cols., 2002; Pelosi e cols., 2003; Rocco & Zin., 2005; Verbrugge e cols., 2007; Matthay & Calfee; 2007; Lu & Chiang, 2007) (Tabela 2).

SDRA Pulmonar	SDRA Extra-Pulmonar		
Causas mais comuns			
Pneumonias	Choque séptico		
	Traumas não torácicos graves,		
Aspiração de conteúdo gástrico	associados a choque e tranfusões		
	múltiplas		
Causas menos comuns			
Trauma torácico grave (contusão pulmonar)	Bypass cardiopulmonar		
Embolia gordurosa	Overdose por drogas		
Quase-afogamento	Pancreatite aguda		
Inalação de gases tóxicos	Coagulação intravascular disseminada		
Edema pulmonar após reperfusão			
Adaptado de Bernard e cols., 1994.			

Tabela 2 – Estratificação da SDRA:

1.2 Patogênese da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo de origem direta e indireta:

As alterações patológicas pulmonares da SDRA são denominadas, em conjunto, como dano alveolar difuso (DAD), manifestado por lesão aguda e difusa nos revestimentos endoteliais e epiteliais das unidades respiratórias terminais e aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, com extravasamento de plasma para o interior do alvéolo e subseqüente formação de edema pulmonar não decorrente da elevação da pressão hidrostática vascular (McIntyre e cols., 2000).

Após a agressão inicial direta ao epitélio alveolar ocorre a ativação de macrófagos alveolares e uma cascata inflamatória determina o início do processo de lesão pulmonar (Wiener-Krnonish e cols., 1991; Ware & Matthay, 2000). A lesão ao epitélio pulmonar promove um extravasamento de fluido rico em proteínas para o espaço alveolar, levando à destruição dos pneumócitos tipo II

(PII), conseqüentemente reduzindo a formação e o *turnover* do surfactante pulmonar. Finalmente, observamos a formação de um parênquima pulmonar desorganizado, podendo evoluir para fibrose pulmonar (Bitterman, 1992).

Em uma tentativa de reparo pulmonar, os pneumócitos tipo II se multiplicam ao longo do septo alveolar para cobrir áreas previamente desnudas da membrana basal. Fibroblastos e miofibroblastos proliferam na parede alveolar, migram através dos hiatos da membrana e convertem o exsudato intra-alveolar em um tecido de granulação. Posteriormente, há deposição de colágeno, surgindo um tecido fibroso e denso, que ocasiona espessamento do septo alveolar. Há proliferação gradual de tecido intersticial com a evolução temporal da SDRA (Tomashefski, 2000; Wallace & Donnelly, 2002). Além disso, foram detectadas algumas fibras de colágeno recém-formadas nos espaços alveolares associadas com miofibroblastos (Fukuda e cols., 1987). Na imagem radiológica da tomografia computadorizada observa-se preenchimento alveolar, consolidação e atelectasias, que ocorrem predominantemente em zonas pulmonares dependentes (Gattinoni e cols., 1994; Piantadosi, 2004).

Vários estudos sugerem que vias regulatórias importantes na morfogênese e desenvolvimento pulmonar regulam, em parte, os mecanismos de resolução e reparo da lesão pulmonar em adultos (Chilosi e cols., 2003; Willis e cols., 2005; Douglas e cols., 2006). A alteração na regulação dessas vias pode resultar em amplificação da lesão inicial e reparo desordenado, com ocorrência de fibrose (Douglas e cols., 2006). Muitos pacientes podem ter a SDRA resolvida nesse estágio, porém, alguns evoluem para a fase fibrótica (Homma e cols., 1992; Fein & Calalang-Collucci, 2000).

A organização do exsudato e o colapso alveolar são os principais mecanismos responsáveis pelo remodelamento da arquitetura alveolar e desenvolvimento de fibrose após LPA (Meduri e cols., 1991; Bellingan, 2002).

O processo fibrótico parece resultar de interação complexa entre fibroblastos e macrófagos. Os fibroblastos migram para áreas de lesão e são estimulados a secretar colágeno e outras proteínas da matriz extracelular. Estas células liberam, também, diversas proteases capazes de

degradar tais proteínas, remodelando o tecido. O estímulo ativador do fibroblasto para remodelar o pulmão inclui: componentes do sangue, como a fibrina, produtos de degradação da matriz e mediadores como fator transformador de crescimento β (TGF- β), liberados por macrófagos e células do parênquima pulmonar (Ward e cols., 1998).

A fibrose intra-alveolar faz-se mais importante do que a fibrose intersticial no remodelamento da estrutura pulmonar, pois resulta em obliteração alveolar, coalescência das paredes alveolares e perda das unidades alvéolo-capilares funcionais (Fukuda e cols., 1987).

A figura 1 resume o mecanismo de lesão presente no estágio inicial da SDRA. Quando a agressão inicial se dá indiretamente ao epitélio alveolar, mediadores liberados na circulação pelo foco extrapulmonar geram as lesões pulmonares. As células endoteliais pulmonares são atingidas via circulação sistêmica e novamente se ativa uma cascata inflamatória, resultando em aumento da permeabilidade da barreira endotelial e recrutamento de células inflamatórias (Pelosi, 2000). Assim, o mecanismo fisiopatológico principal envolvido na etiologia indireta da LPA resulta em congestão microvascular e o edema intersticial, podendo levar ao extravasamento de líquido para o espaço alveolar (Ware & Matthay, 2000).





1.3 Organização da matriz extracelular e remodelamento do tecido pulmonar na SDRA

No pulmão normal, as proteínas da matriz extracelular (MEC) são secretadas localmente por células da própria matriz, de modo mais evidente pelo fibroblasto, e organizadas em uma rede nos espaços que circundam as células. Entretanto, a MEC ocupa um volume significativo no tecido e não representa um material inerte, que somente proporciona suporte estrutural; pelo contrário, possui informações que orientam migração, ligação, diferenciação e organização das células, modulando, assim, uma série de processos (Raghow, 1994). Desta forma, a morfologia de cada célula representa um reflexo da composição da MEC, já que uma gama de "informações" pode ser transmitida para o citoesqueleto, por meio de interações específicas

7

com receptores de superfície da membrana celular (Goldstein, 1991; Alberts e cols., 1994; Cotran e cols., 1999; Park e cols., 2001; Chen e cols., 2001; Suki e cols, 2005; Pelosi, 2007).

Três grupos de macromoléculas associam-se fisicamente para formar a matriz extracelular:

1 – proteínas estruturais fibrosas, como as fibras colágenas e elásticas;

2 – glicoproteínas, incluindo fibronectina e laminina;

3 – proteoglicanos e glicosaminoglicanos (GAG's)

Essas moléculas organizam-se em duas porções do tecido: a matriz intersticial e a membrana basal (Cotran e cols., 1999).

1.3.1 Fibras colágenas

As fibras colágenas representam os principais constituintes da MEC. Apesar de sua grande diversidade no tecido conjuntivo, as principais são as do tipo I, II, e III, fibrilares ou intersticiais, e as dos tipos IV, V e VI, não fibrilares ou amorfas. O colágeno I constitui a principal proteína estrutural do interstício pulmonar, produzido em grandes quantidades durante o desenvolvimento do pulmão e nas reações fibróticas (Goldstein, 1991). O *turnover* de colágeno no pulmão compõe um processo dinâmico, necessário para a manutenção de sua arquitetura normal (Armstrong e cols., 1999; Rocco e cols., 2003; Suki e cols, 2005).

Nas lesões leves a produção de colágeno é limitada e se restaura a arquitetura do pulmão. Quando a lesão envolve pleura, brônquios e parênquima, o reparo pode resultar na formação de cicatriz focal. Após lesão grave, a cicatriz pode ser generalizada e resultar em extensa destruição da arquitetura e da função do pulmão, indicando que o processo biomecânico implicado na síntese de colágeno tem a capacidade de reagir muito rapidamente à agressão (Chesnutt e cols., 1997; Armstrong e cols., 1999; Marshall e cols., 2000, Rocco e cols., 2001; Rocco e cols., 2004).

A fibrogênese ocorre precocemente no curso da lesão e níveis elevados de prócolágenos I e III no plasma e no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) no primeiro dia de SDRA apontam para a precocidade da síntese de colágeno na resposta à agressão (Baughman e cols., 1996; Park e cols., 2001; Chen e cols., 2001; Tasaka e cols., 2002).

Marshall e cols. (Marshall e cols., 2000) e Chesnutt e cols. (Chesnutt e cols., 1997) demostraram grande atividade mitogênica e aumento nos níveis de pró-colágeno III no fluido do lavado bronco-alveolar (BALF) de pacientes após 24 horas de diagnóstico de SDRA, reforçando a hipótese de que a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno são rapidamente reguladas, indicando que o processo fibroproliferativo pode ser estabelecido assim que a lesão for desencadeada, e não tardiamente, como anteriormente preconizado.

Armstrong e cols. (Armstrong e cols., 1999) evidenciaram aumento nos níveis de prócolágeno tipo I e diminuição na titulação de marcadores da degradação do colágeno no BALF de pacientes com SDRA e 48 horas de ventilação mecânica, sugerindo um desequilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno, favorecendo a sua deposição em um estágio precoce da doença.

A substituição do colágeno tipo III por tipo I, mais rígido, pode responder por distúrbios nas trocas gasosas e alterações fisiológicas, nos estágios tardios de fibrose (Entzian e cols., 1990).

Colágenos I e III são sintetizados como pró-colágenos, que possuem pró-peptídeos em ambas as terminações de suas cadeias α . Fibroblastos e outras células mesenquimais secretam pró-colágenos recém-formados, após uma endopeptidase específica clivar os própeptídeos aminoterminal e carboxiterminal das cadeias α , formando moléculas de colágeno e pró-peptídeos N-terminal e C-terminal. Níveis de pró-peptídeos aminoterminal elevados no plasma refletem síntese de colágeno no sítio da doença e constituem, portanto, marcadores de processo reparativo (Pugin e cols., 1999).

A quantidade de colágeno depositada depende da extensão do dano celular, da intensidade de proliferação de fibroblastos e de substâncias efetoras presentes na inflamação, além de hipoperfusão vascular e alterações da PaO₂, que ocorrem durante a lesão pulmonar. TGF-β e peptídeos relacionados à insulina podem elevar a produção de colágeno por

fibroblastos e células de músculo liso, além de inibir indiretamente a produção e a atividade de colagenase (Meduri, 1999).

À medida que o reparo progride, os fibroblastos sintetizam e depositam quantidades aumentadas de componentes da MEC. Diversos agentes intensificam a síntese de colágeno: fatores de crescimento [fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), família de fatores de crescimento (FGF), TGF- β] e citocinas [interleucinas 1 (IL-1) e 4 (IL-4)], secretados por leucócitos e fibroblastos. Entretanto, o acúmulo final de colágeno não depende apenas de sua síntese, mas também de sua degradação (Cotran e cols., 1999; Suki e cols., 2005).

1.3.2 Fibras elásticas

Associadas às fibrilas de colágeno, encontram-se as fibras elásticas, que fornecem elasticidade ao tecido. São sintetizadas por muitos tipos celulares no pulmão, incluindo condroblastos, miofibroblastos e células musculares lisas (Starcher, 2000).

O sistema elástico possui três componentes definidos de acordo com a quantidade crescente de elastina e orientações das fibrilas: a) fibras oxitalânicas, compostas por um feixe de microfibrilas; b) fibras elaunínicas, compostas por microfibrilas e uma quantidade pequena de elastina e c) fibras elásticas maduras, compostas por microfibrilas e abundante elastina (Gerli e cols., 1990).

Ao nível ultra-estrutural, as fibras elásticas maduras dos mamíferos são formadas por um cilindro central sólido, composto por abundante material amorfo e homogêneo (elastina), envolto por microfibrilas (10 a 12 nm de diâmetro) que, em corte transversal, apresentam perfil tubular. Durante o desenvolvimento da fibra, surge, inicialmente, um simples feixe de microfibrilas e, a seguir, observa-se deposição gradual de elastina entre as microfibrilas, até a maturação completa.

As propriedades das fibras elásticas dependem de seu componente amorfo. Nos processos de reparação pulmonar, após a destruição de fibras maduras do sistema elástico, ocorre gradual substituição por fibras mais imaturas, pobres em elastina (oxitalânicas) e,

portanto, menos extensíveis. As fibras oxitalânicas não se alongam sob estresse mecânico, prevenindo estiramento excessivo dos tecidos, enquanto as fibras elaunínicas apresentam propriedades elásticas intermediárias entre as fibras elásticas maduras e as oxitalânicas.

A elastina é extremamente estável e resiste à ação de proteases. A renovação da elastina faz-se necessária para o crescimento tecidual e remodelamento, se constitui em processo muito lento, e requer enzimas específicas para iniciar sua degradação, de forma que, sob condições normais, ocorre pouco remodelamento na vida adulta (Montes, 1992).

Após uma agressão, as fibras elásticas, assim como as fibras colágenas, também se reorganizam durante o remodelamento da MEC. Estudos em modelos animais de SDRA grave evidenciam deposição de fibras elásticas no processo de reparo 24 horas após o início da lesão, devendo-se isso à maior deposição de fibras oxitalânicas (Rocco e cols., 2000, Rocco e cols., 2003, Rocco e cols 2004,). Além disso, observa-se duplicação da expressão de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) para elastina após três semanas de lesão induzida por bleomicina em hamsters (Raghow e cols., 1985). Dessa forma, pode-se acreditar que o processo de fibroelastose — e não somente fibrose — ocorre na evolução da SDRA.

A fibroelastose pode resultar de reparo e remodelamento subseqüentes à inflamação septal e fragmentação de fibras elásticas. Além disso, esse processo pode ser parcialmente responsável pela perda da arquitetura normal das paredes alveolares, contribuindo para a tendência ao colapso e para a resolução da inflamação. Observa-se reativação da síntese de elastina em resposta à intensa destruição do sistema elástico, porém de forma desorganizada, com conseqüências deletérias às propriedades mecânicas pulmonares (Negri e cols., 2000).

1.3.3 Glicoproteínas e integrinas

Além das proteínas estruturais fibrosas, também estão presentes na MEC as glicoproteínas adesivas e as integrinas, proteínas estruturalmente diversas, cuja principal propriedade é a capacidade de se ligar a outros componentes da MEC, por um lado, e a proteínas específicas integrantes da membrana celular, pelo outro. A fibronectina e a laminina

constituem as principais proteínas adesivas do parênquima pulmonar (Snyder e cols., 1990; Cotran e cols., 1999).

Os fibroblastos, monócitos, células endoteliais e outras células produzem a fibronectina, cuja principal função consiste em promover a ligação entre os diversos componentes da MEC, incluindo colágeno, fibrina e proteoglicanos, bem como às células. Ela é importante, também, para potencializar a sensibilidade de certas células aos efeitos proliferativos dos fatores de crescimento.

A laminina representa a glicoproteína mais abundante nas membranas basais e atravessa a lâmina basal se ligando, por um lado, a receptores específicos sobre a superfície das células e, por outro lado, a componentes da MEC, como o colágeno IV e o heparan-sulfato. Além disso, acredita-se que a laminina atue como mediador da ligação da célula a substratos do tecido conjuntivo.

As integrinas constituem a principal família de receptores de superfície celular responsável pela fixação da célula à MEC. Em virtude de seu papel na adesão, constituem componentes-chave no extravasamento de leucócitos, na agregação plaquetária, nos processos de desenvolvimento e cicatrização de feridas. Algumas células exigem adesão para sua proliferação e a falta de fixação a elementos da MEC, por meio das integrinas, induz apoptose (Cotran e cols., 1999).

1.3.4 Proteoglicanos e glicosaminoglicanos

As moléculas de proteoglicanos formam, no tecido conjuntivo, uma substância gelatinosa e hidratada, onde se encontram as proteínas fibrosas. São compostas por uma proteína central ligada a um ou mais polissacarídeos, denominados glicosaminoglicanos (Ebihara e cols., 2000). Dentre os mais comuns, estão o heparan-sulfato, o condroitin-sulfato e o dermatan-sulfato.

Os proteoglicanos também podem ser proteínas integrantes da membrana e, portanto, moduladores do crescimento e da diferenciação celular.

O ácido hialurônico é encontrado na MEC de várias células e atua como ligante para proteínas centrais, constituindo o arcabouço para grandes complexos de proteoglicanos. Além disso, associa-se a receptores de superfície celular, que regulam a proliferação e a migração das células. Liga-se, também, a grande quantidade de água, formando um gel hidratado e viscoso encontrado na matriz de células em migração e proliferação, inibindo a adesão entre as células e facilitando a migração celular (Cotran e cols., 1999).

Os proteoglicanos fornecem, portanto, suporte mecânico ao tecido, permitindo a difusão de moléculas hidrossolúveis e migração celular. São importantes, ainda, na sinalização química entre as células, ligando-se a moléculas sinalizadoras, podendo aumentar ou inibir suas atividades. Além disso, influenciam a formação da fibra colágena e interagem com várias citocinas e fatores de crescimento (Miserocchi e cols., 2001). Nos tecidos encontram-se freqüentemente ligados às fibras colágenas, fibras elásticas e fibronectina, participando da organização da MEC (Alberts e cols., 1994).

Os efeitos dos proteoglicanos e a sua presença no remodelamento tecidual do pulmão sugerem que podem influenciar precocemente o processo de reparo, por meio de sua atuação nas funções dos miofibroblastos (Bensadoun e cols., 1996).

Os GAGs são polissacarídeos longos e lineares, que consistem de unidades dissacarídeas que se repetem com seqüências que variam na composição básica do sacarídeo, ligação, acetilação e N- e O-sulfatação. Adicionalmente, o comprimento de suas cadeias pode variar de 1 a 25.000 unidades dissacarídeas. Existem duas principais classes de GAGs: 1) GAG não sulfatado: ácido hialurônico e 2) GAGs sulfatados: condroitin sulfato, dermatan sulfato, queratan sulfato, heparan sulfato) e heparina. No parênquima pulmonar, o GAG mais abundante é o heparan sulfato. Os GAGs são envolvidos em uma variedade de processos biológicos, incluindo interações célula-matriz e ativação de quimiocinas, enzimas e fatores de crescimento (Taylor & Gallo, 2006). Esses processos são mediados através da capacidade de interagirem com numerosas proteínas, incluindo proteases, citocinas, moléculas de adesão e fatores de

crescimento (Handel e cols., 2005). Com exceção do ácido hialurônico, os GAGs são encontrados sob a forma de proteoglicanos (Johnson e cols., 2005).

Apesar de existirem muitos estudos acerca do papel dos proteoglicanos em uma variedade de doenças pulmonares (Cantor e cols., 1995; Bray, 2001; Turino & Cantor, 2003; Bai e cols., 2005), o comportamento dos GAGs no parênquima pulmonar é muito pouco compreendido (Sousa e cols., 2006).

1.3.5 Metaloproteinases

As metaloproteinases (MMP) representam uma família de enzimas proteolíticas contendo um íon zinco no sítio ativo do domínio catalítico. Estas enzimas possuem, ainda, uma variedade de domínios especializados, que contribuem para o reconhecimento e interação com o substrato específico ou com outras proteínas e moléculas (Parks e cols., 2001; Greenlee e cols., 2007).

As MMPs são secretadas em uma forma latente, como pró-enzimas inativadas, e, subseqüentemente, sofrem ativação nos meios pericelular ou extracelular (Birkedal-Hansen, 1995 e Ohbayashi, 2002).

No tecido adulto normal, expressas em pequenas quantidades, as metaloproteinases possuem um papel importante no *turnover* normal e manutenção da matriz extracelular, na integridade da membrana basal, no remodelamento normal do tecido durante a embriogênese, no reparo tecidual, inflamação, na lesão pulmonar induzida pela ventilação (LPIV), invasão tumoral e metástase (Ohbayashi, 2002). Atuam relevantemente na remoção das proteínas em excesso, mas também podem destruir a arquitetura normal do pulmão (Meduri, 1999).

Atualmente, pelo menos vinte e quatro tipos de MMPs foram identificados e podem ser agrupados em cinco subclasses, especificadas simplificadamente na tabela 3. MMP-2, MMP-9, MMP-7 e MMP-12 degradam principalmente colágeno tipo IV. Entre essas MMPs, MMP-2 e MMP-9 têm merecido especial atenção devido ao seu papel patogênico em diversas doenças pulmonares. A MMP-9 apresenta um papel chave no remodelamento e no reparo tecidual por meio desta sua atividade catalítica de colágeno IV (Ohbayashi, 2002).

As colagenases constituem parte de uma família de MMP, que clivam os colágenos I, II e III em um sítio específico. Os fragmentos resultantes mostram-se mais suscetíveis à digestão por gelatinases (MMP-2 e MMP-9), facilitando sua remoção do tecido (Corbel e cols., 2000). Gelatinase A (ou MMP-2) e gelatinase B (ou MMP-9) degradam colágeno IV, fibronectina e elastina. A MMP-2 se distribui pelo parênquima pulmonar, enquanto que a MMP-9 encontra-se nos macrófagos intra-alveolares livres e células epiteliais alveolares (Miserocchi e cols., 2001). As MMPs de membrana degradam várias proteínas da superfície celular e a elastase degrada elastina e fibronectina (Pardo e cols., 1996).

Muitas das metaloproteinases secretadas, como as colagenases 1, estromelisinas 3 e gelatinase-B não são expressas por tecidos em condições normais, permanecendo a sua produção e atividade próximas de níveis não detectáveis (Parks e cols., 2001).

Macrófagos alveolares, neutrófilos, células epiteliais das vias aéreas e eosinófilos sintetizam e secretam as MMPs (Ricou e cols., 1996 e Ohbayashi, 2002). Fatores de crescimento e citocinas podem induzir [IL-1, TNF-α, TNF-β, TGF-α, fator de crescimento epidérmico (EGF), FGF e PDGF] ou inibir (TGF-β, INFγ IL-4) a transcrição dos genes de metaloproteinases (Goldestein, 1991; Elkington e cols., 2006; Greenlee e cols., 2007). Uma vez formadas, as MMPs ativadas são rapidamente inibidas pela α-2 macroglobulina, a qual atua restritamente nos seus sítios de atividade e pela interação com uma família de inibidores teciduais específicos das metaloproteinases (TIMP). Estes são produzidos pela maioria das células mesenquimais, impedindo, assim, a ação descontrolada dessas das MMPs (Ricou e cols., 1996; Cotran e cols., 1999; Corbel e cols., 2000 e Ohbayashi, 2002; Lagente e cols., 2005). Quatro diferentes tipos de TIMPs foram caracterizados (TIMP-1 a TIMP-4). TIMPs formam complexos covalentes com as MMPs, havendo especificidades: TIMP-1 inibindo MMP-9 e TIMP-2 inibindo MMP-2 são os mais conhecidos (Ohbayashi, 2002). Os TIMPs ligam-se respeitando uma relação molar 1:1 ao

15

sítio ativo das MMPs, resultando em perda da atividade proteolítica das mesmas (Lanchou e cols., 2003; Lagente e cols., 2005).

Subclasses	MMP	Substratos específicos
Colagenases intersticiais	MMP-1, MMP-8, MMP- 13 e MMP-18	Colágenos I, II, III, VII, VIII, X e agrecan.
Gelatinases	MMP-2 e MMP-9	Colágenos I, II, III, IV, V, VII, X, elastina, agrecan e fibronectina.
Estromelisinas	MMP-3, MMP-10 e MMP-11	Colágenos II, III, IV, V, IX, X, elastina, fibronectina, agrecan e laminina.
	MMP-14- MMP-15,	Colágenos I, II, III, agrecan,
MMPs Tipo membrana	MMP-16, MMP-17,	laminina, fibronectina entre outros
	MMP-24 e MMP-25	substratos desconhecidos.
	MMP-7, , MMP-12,	Colágenos tipos II, III, IV, IX, X,
	MMP-19, MMP-20,	fibronectina, agrecan, laminina,
mauliisinas	MMP-21, MMP-23	elastina e outros desconhecidos.

Tabela 3: Família das Metaloproteinases

Adaptado de Ohbayashi, 2002

Tratamento com inibidores de MMPs foram correlacionados recentemente com integridade histológica e fisiológica do pulmão, sugerindo que o aumento da atividade das proteases na MEC desempenha papel importante no desenvolvimento da lesão pulmonar associada à SDRA (Carney e cols., 2001). TIMPs possuem um papel importante no equilíbrio entre deposição e degradação dos componentes da MEC em vários processos fisiológicos, incluindo inflamação e doenças crônicas degenerativas (Ohbayashi, 2002; Elkington e cols., 2006). Ricou e cols. (Ricou e cols., 1996) estabeleceram que o equilíbrio entre MMPs e TIMPs interfere com a evolução da lesão pulmonar aguda e da SDRA e influencia o resultado final deste processo biológico.

Por clivar os componentes da MEC, as MMPs têm papel significativo no processo de reparo do epitélio alveolar durante a lesão pulmonar aguda. Durante os processos inflamatórios agudos, polimorfonucleares, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos são recrutados da circulação para sítios específicos do tecido lesado. Tais células inflamatórias desempenham suas funções pela liberação de MMPs nos espaços pericelulares. As MMPs são secretadas para facilitar a remoção dos agentes nocivos, porém quando presentes em excesso podem destruir as células residentes e estimular, ainda mais, o processo inflamatório (Greenlee e cols., 2007).

O lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) constitui um potente indutor da inflamação pulmonar aguda associada a infiltrado de polimorfonucleares. Estudou-se o papel das MMPs em modelo utilizando LPS como precursor da LPA (Corbel e cols., 2000). A exposição ao LPS levou ao aumento de MMP-2 e MMP-9 no fluido do lavado bronco-alveolar (BALF) (Corbel e cols., 1999). Pugin e cols. observaram elevação dos níveis de MMP-9 liberada no plasma de indivíduos normais submetidos a injeção intravenosa de LPS, sendo os polimorfonucleares identificados como os responsáveis por sua secreção (Pugin e cols., 1999). Outros relatos evidenciaram que o tratamento com corticoesteróide também reduz o número de células inflamatórias e a atividade de MMP-2 e MMP-9 (Corbel e cols., 1999).

MMPs sozinhas não determinam, certamente, o curso clínico da SDRA. Entretanto, crescem as evidências de que citocinas e MMPs interagem intimamente, para modular o remodelamento do tecido pulmonar (Ricou e cols., 1996).

1.4 Mecanismos de remodelamento

Em muitas doenças intersticiais, agudas e crônicas, observam-se alterações irreversíveis da histoarquitetura pulmonar, ponto muito abordado atualmente na literatura.

Fibroproliferar significa induzir uma reação reparativa estereotipada à lesão tecidual, caracterizada pela substituição de células epiteliais lesadas por miofibroblastos e seus produtos
do tecido conjuntivo nos espaços aéreos, interstício, bronquíolos respiratórios e paredes da microcirculação intra-acinar. (Meduri, 1996; Belligan, 2002).

O remodelamento traduz-se em um processo dinâmico de balanço entre lesão inflamatória e reparo tecidual para a produção de matriz. Este processo, existente em todos os órgãos, tanto pode levar à reconstrução nos moldes pré-agressão ou em padrões anormais. Atualmente, sabe-se que a resposta fibroproliferativa começa quase imediatamente após o início da lesão, em uma tentativa de reparar o dano à parede alvéolo-capilar (Lin e cols., 2003). O acúmulo de células inflamatórias e a entrada de plasma nos espaços alveolares alteram o microambiente alveolar, conduzindo a evolução do remodelamento tecidual para a fibrose progressiva ou para a restauração da arguitetura alveolar normal (Galen, 1999).

O processo de reparo deve começar com a reversão do edema e retirada de proteínas solúveis e insolúveis, acumuladas nos espaços intersticial e alveolar. Precocemente, tal processo também envolve reepitelização da barreira alvéolo-capilar, com proliferação de PII e formação de novos capilares (angiogênese). Simultaneamente, há proliferação de fibroblastos associada com deposição excessiva de MEC, que contribui para complacência pulmonar diminuída e perda da arquitetura alveolar normal. A resolução dessa alveolite fibrosante requer mais remodelamento do pulmão, com resolução gradual da fibrose pulmonar e restauração das unidades alvéolo-capilares (Artigas e cols., 1998). Os principais moduladores promotores da migração de células epiteliais alveolares são proteínas de ligação à heparina, tais como EGF, TGF- α , fator de crescimento para queratinócito (KGF), fator de crescimento para hepatócito (HGF) e FGF (Panos e cols., 1993). Pode ocorrer a liberação de outros mediadores capazes de aumentar o reparo pulmonar no espaço alveolar de pacientes com SDRA. Por exemplo, a IL-1 β , que parece mediar ativamente o reparo epitelial, encontra-se biologicamente ativa no fluido do edema pulmonar de pacientes com SDRA na fase precoce da lesão (Pugin e cols., 1999).

A existência de uma barreira epitelial intacta representa um fator importante para o remodelamento pulmonar, pois o reparo do pulmão lesado envolve interações complexas entre células endoteliais, epiteliais, fibroblastos, macrófagos alveolares, fatores de coagulação,

citocinas e fatores de crescimento (Geiser 2003). Além disso, a produção normal de surfactante requer pneumócitos II intactos e o mecanismo envolvido na retirada do fluido alveolar depende do transporte ativo de sódio, que também requer uma barreira epitelial intacta (Artigas e cols., 1998). Quando a integridade e a função do epitélio alveolar mantêm-se preservadas, a retirada do líquido alveolar pode ser estimulada mesmo na presença de edema intersticial (Berthiaume e cols., 2002; Matthay, 2002; Ingber, 2006).

O transporte de sódio através do epitélio alveolar representa um papel importante na resolução do edema alveolar. Os mecanismos do transporte de sódio incluem participação dos canais de sódio sensíveis à amilorida na membrana apical dos pneumócitos tipo II, seguida por extrusão do sódio pela bomba de Na,K-ATPase localizada na superfície basolateral da célula epitelial. Pneumócitos tipo I também apresentam um importante papel no transporte de sódio através do epitélio alveolar, pois esta célula compreende mais de 90% da área de superfície alveolar (Groshaus e cols., 2004).

O transporte de água segue passivamente o gradiente osmótico e ocorre através de canais de água chamados aquaporinas (AQP) (Laffon e cols., 2002; Matthay, 2002). As AQPs distribuemse ao longo dos tecidos broncopulmonares, mas não constituem fator essencial para alcançar um máximo transporte de fluido epitelial (Borok e cols., 2002). A AQP1 se expressa no endotélio microvascular, enquanto AQP3 e AQP4 nas grandes vias aéreas. AQP4 também está presente nas pequenas vias aéreas. AQP5 localiza-se nos pneumócitos tipo I e nas glândulas submucosas das células acinares. Os principais canais de água são AQP1 e AQP5. A diminuição da presença de AQP5 nas glândulas submucosas das vias aéreas superiores representa a única alteração efetivamente capaz de reduzir o transporte de fluido (Groshaus e cols., 2004).

O tipo de célula epitelial a recobrir a superfície alveolar depende, em parte, da extensão da lesão. PII proliferam e se diferenciam em PI em áreas pouco lesadas do pulmão, enquanto células epiteliais brônquicas recobrem áreas onde nenhum PII sobrevive (Galen, 1999).

Um influxo de fatores de coagulação para o espaço alveolar também contribui para o acúmulo de fibrina intra-alveolar. Durante a lesão pulmonar aguda, a atividade pró-coagulante alveolar aumenta na mesma proporção que a deposição de fibrina (Galen, 1999). A remoção de fibrina intra-alveolar é importante para a resolução da doença. Se a fibrina extravascular for removida, torna-se possível a reconstituição do espaço alveolar normal. Se a fibrina permanece, fibroblastos migram para a matriz de fibrina e secretam colágeno intersticial. Formam-se, então, cicatrizes fibróticas, paredes alveolares espessas ou espaços aéreos obliterados, dependendo da localização e extensão do exsudato residual (Galen, 1999).

A fibrina tecidual pode influenciar a inflamação alveolar local e o reparo tecidual por vários mecanismos: 1) alteração da migração de células inflamatórias, incluindo macrófagos e fibroblastos, 2) prevenção da proliferação de linfócitos, 3) desorganização das células endoteliais e 4) aumento da permeabilidade vascular (Idell, 2003).

O endotélio pulmonar responde por numerosos processos fisiológicos e imunológicos, além de ser sítio de ligação para várias enzimas, receptores e fatores de transcrição, que interagem com constituintes da parede do vaso e células sanguíneas circulantes (Orfanos e cols., 2004). O aumento da permeabilidade vascular pulmonar representa uma marca da patogênese da SDRA, podendo resultar da ação de citocinas ou outros agentes, e, também, de mecanismos relacionados ao citoesqueleto da célula endotelial em resposta a estímulos, como trombina ou estiramento mecânico (Dudek e cols., 2001).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) constitui um importante indutor da permeabilidade vascular. O aumento da expressão de VEGF está relacionado à perda capilar generalizada, sugerindo seu papel no desenvolvimento do edema pulmonar (Kaner e cols., 2000). Além disso, VEGF e outras moléculas relacionadas possuem grande influência sobre a biologia da célula endotelial, regulando a proliferação celular, angiogênese e recrutamento de monócitos.

Apesar das células endoteliais serem os alvos primários, o VEGF também pode estimular a produção de surfactante pelos pneumócitos tipo II (Compernolle e cols., 2002) e o crescimento

de células epiteliais das vias aéreas *in vitro* (Brown e cols., 1999). A expressão e a função do VEGF na SDRA variam, dependendo das condições fisiopatológicas, tempo e grau de lesão da barreira alvéolo-capilar. É possível que, na fase precoce da lesão pulmonar, a resposta inflamatória aguda induzida pela liberação do VEGF, a partir de células epiteliais alveolares e leucócitos, aumente a permeabilidade do endotélio pulmonar, contribuindo para a formação do edema intersticial. Com a progressão do edema pulmonar, a lesão da camada epitelial alveolar pode reduzir a produção de VEGF. Durante o período de recuperação, VEGF pode participar do processo de angiogênese, sendo importante para o reparo pulmonar (Mura e cols., 2004). Estudos recentes demonstraram a contribuição da apoptose para a patogênese da fibrose pulmonar, bem como para a sua resolução (Uhal, 2002; Martin e cols., 2003). A apoptose pode ter rersultados benéficos ou deletérios, dependendo do tipo celular, das circunstâncias e da

duração. O pulmão, um órgão complexo, possui diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos e células inflamatórias. (Lu e cols., 2005). A apoptose de miofibroblastos e fibroblastos em pulmões fibróticos, por exemplo, pode ser benéfica porque essas células constituem as principais fontes da MEC em excesso na fibrose pulmonar. A apoptose de células inflamatórias também pode ter resultados positivos, mas, quando em excesso, pode levar à destruição do septo alveolar e a uma resposta fibrótica (Li e cols., 2004). A necrose remove os neutrófilos que migraram para uma área de inflamação, com liberação de mediadores tóxicos, ou por apoptose, envolvendo a involução de células individuais, com pequeno dano ao tecido (Ingbar, 2000). Os macrófagos rapidamente fagocitam os neutrófilos apoptóticos antes da perda da integridade da membrana. Dessa forma, a apoptose fornece um meio de remover neutrófilos de uma área, com mínimo dano tecidual (Matute-Bello e cols., 2000).

Na lesão pulmonar tardia, a apoptose também exerce papel importante no processo de reparo, eliminando tecido de granulação e neutrófilos em excesso, sendo fundamental para a remoção do componente intra-alveolar da fibrose, além de retirar do epitélio alveolar um número excessivo de PII (Galen, 1999).

A regulação do remodelamento da MEC, em condições normais e em numerosas doenças pulmonares como na SDRA, resulta de um complexo mecanismo integrativo da transcrição de elementos que degradam as proteínas da matriz e produzem ativação/inibição de diversos tipos celulares do tecido pulmonar (Swideski e cols., 1998). Alguns dos fatores de crescimento estimuladores da síntese de moléculas do tecido conjuntivo também modulam a degradação e a ativação de enzimas, cujas ações consistem em remodelar o tecido conjuntivo (Contran, 1999).

Na SDRA, as lesões epitelial e endotelial disparam uma seqüência de eventos, como o influxo de células inflamatórias liberadoras de citocinas, ativando fibroblastos e potencializando a síntese e a atividade de MMPs e TIMPs (Swideski e cols., 1998; Park e cols., 2001; Lanchou e cols., 2003; Greenlee e cols., 2007).

1.5 Modelo de SDRA mediada por Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede externa de bactérias Gram negativas, é uma substância biológica extremamente ativa, capaz de iniciar respostas inflamatórias por meio de sua interação com proteínas séricas (proteína LBP/receptor CD14) ou com proteínas do surfactante pulmonar. Portanto, pode ser capaz de desencadear o processo inflamatório pulmonar observado na SDRA por interação direta com os constituintes do espaço alveolar ou por via hematogênica, levando à produção de citocinas.

Em indivíduos normais, as bactérias Gram negativas residem primariamente no trato gastrointestinal, onde barreiras intactas previnem sua translocação para a circulação sistêmica (Bone , 1994). Todavia, alguns fatores podem levar à translocação bacteriana, como: (1) alteração da flora do hospedeiro, resultando em crescimento bacteriano exagerado; (2) disfunção imunológica do indivíduo; e (3) aumento da permeabilidade através da barreira epitelial (Feltis e cols., 1994; Go e cols., 1995). Uma vez na circulação, o LPS interage diretamente com leucócitos e células parenquimatosas, induzindo a cascata inflamatória.

A endotoxina foi reconhecida como um importante mediador na patogênese da SDRA em 1974, quando a infusão de *Pseudomonas* em ovelhas resultou em aumento da permeabilidade pulmonar e um quadro similar ao edema pulmonar não cardiogênico (Brigham e cols., 1974). Naquela época, essas observações levaram à hipótese de que a endotoxina, provavelmente junto com a ativação do sistema complemento, era o mediador mais importante no desenvolvimento da lesão pulmonar, dando início a uma série de estudos a respeito da atuação das endotoxinas (Meyrick BO, 1986; Lopez e cols., 1998; Fox-Dewhurst e cols., 1997; Parson e cols., 1989; Wierner-Kronish e cols., 1991; Watson e cols., 1994; Delclaux e cols., 1997; Li e cols., 1998; Yamada e cols., 2000).

Meyrick & Brigham (Meyrick & Brigham, 1983) demonstraram, em ovelhas, as alterações funcionais e estruturais dos pulmões após 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 aproximadamente 2 horas após a infusão, favorecendo uma intensa permeabildade vascular. O principal efeito da endotoxina nas ovelhas foi o aumento da permeabilidade microvascular do pulmão, que resultou em um edema pulmonar não cardiogênico, sabidamente a principal anormalidade na SDRA em seres humanos.

Pelo fato das lesões pulmonares e as características fisiopatológicas serem similares às que ocorrem na SDRA em humanos, os modelos animais com endotoxina são muito utilizados e adequados para estudar essa síndrome.

Há vários estudos experimentais e clínicos acerca da participação do LPS na LPA (Meyrick, 1986; Fox-Dewhurst e cols., 1997; Stamme e cols., 1999, Menezes e cols., 2005). Parsons e cols., em 1989, mediram as concentrações de LPS no plasma de pacientes com LPA e

23

naqueles com riscos de desenvolver a LPA (Parsons e cols., 1989). Nesta população estavam incluídos pacientes com sepse, pancreatite, transfusões múltiplas e trauma, e se detectou a endotoxina em 74% das amostras plasmáticas obtidas nos dois grupos de pacientes. Além do mais, os níveis plasmáticos de endotoxinas mostraram-se significativamente elevados nos pacientes que já haviam desenvolvido a LPA (64%).

1.6 Mecânica Respiratória

1.6.1 Noções básicas

A respiração representa um processo cíclico, envolvendo trabalho mecânico dos músculos respiratórios para a movimentação do sistema respiratório. Dois componentes constituem o sistema respiratório: o pulmão e a parede torácica. Como parede torácica subentendem-se todas as estruturas em movimento durante o ciclo respiratório à exceção dos pulmões. A pressão motriz, gerada pela contração muscular durante a inspiração, precisa vencer forças de oposição, tais como: a) forças elásticas dos tecidos pulmonares e parede torácica; b) forças resistivas resultantes do fluxo de gás pelas vias aéreas e movimentação das moléculas constituintes do tecido pulmonar e dos tecidos da parede torácica (D'Angelo e cols., 1994); c) forças viscoelásticas dos tecidos pulmonares e da parede torácica; d) forças plastoelásticas responsáveis pela histerese (Hildebrandt, 1970); e) forças inerciais (dependem da massa dos tecidos e dos gases) (Mead, 1961); f) forças gravitacionais (incluídas nas forças elásticas) (Milic-Emili, 1977); e g) forças de distorção da parede torácias e de distorção da parede como desprezíveis (Rodarte & Rehder, 1986).

A elasticidade é uma propriedade da matéria que permite ao corpo retornar à sua forma original após ter sido deformado por uma força sobre ele aplicada. Um corpo perfeitamente elástico como uma mola, obedecerá à lei de Hooke, ou seja, a variação de comprimento é diretamente proporcional à força aplicada, até que seu limite elástico seja atingido. Em visão tridimensional, teríamos volume proporcional à pressão.

O tecido pulmonar e a parede torácica possuem propriedades elásticas e obedecem à lei de Hooke, ampliada, de modo que quanto maior a pressão motriz, maior o volume de gás inspirado. A inclinação da curva volume-pressão ou a relação entre a variação de volume gasoso mobilizado (ΔV) e a pressão motriz necessária para manter o sistema respiratório insuflado é conhecida como complacência do sistema respiratório (Crs). Logo, Crs = ΔV /Pel,rs, onde Pel,rs corresponde à pressão elástica do sistema respiratório.

Cabe ressaltar que, ao invés de complacência, utiliza-se freqüentemente a variável elastância. Esta corresponde ao inverso da complacência (Ers = 1/Crs), ou seja, representa é a relação entre a variação de pressão e o volume mobilizado resultante. O cálculo da elastância do sistema respiratório apresenta vantagens, já que as elastâncias do pulmão (EL) e da parede torácica (Ew) são adicionadas diretamente: Ers = EL + Ew, enquanto que se somam os inversos das complacências: 1/Crs = 1/CL + 1/Cw.

Um simples valor de complacência do sistema respiratório informa pouco, uma vez que depende do volume pulmonar total, isto é, pessoas com grandes volumes pulmonares terão maior complacência para um mesmo volume inspirado do que aquelas com pequenos volumes pulmonares, mesmo que ambos os pulmões sejam normais e sofram uma mesma distensão. Para contornar este evento, determina-se a complacência específica (Csp), ou complacência dividida pelo volume pulmonar, sendo este usualmente a CRF. A Csp é muito utilizada para comparar pulmões de diferentes tamanhos, como de crianças e adultos.

Dois fatores respondem pelo comportamento elástico do pulmão. Um deles é representado pelos componentes elásticos do tecido pulmonar (fibras elásticas e colágenas). Acredita-se que o comportamento elástico do pulmão não dependa do simples alongamento das fibras de tecido conjuntivo, mas, principalmente, do seu arranjo geométrico. Todas as estruturas pulmonares encontram-se interligadas pela trama de tecido conjuntivo pulmonar, de forma que, quando há insuflação, todos esses componentes

se dilatam. Esse fenômeno chama-se "interdependência" e contribui para manter todos os espaços aéreos abertos.

Além das propriedades elásticas dos tecidos pulmonares, os pulmões ainda apresentam um importante fator a contribuir para as suas características elásticas: a tensão superficial exercida pelas moléculas recobrindo a zona de troca gasosa.

Existe tensão superficial em uma interface ar-líquido porque as moléculas do líquido são atraídas com maior intensidade para o interior do próprio líquido do que para a fase gasosa acima deste. A tensão superficial pode ser definida como a força que age sobre uma linha imaginária de 1 cm de comprimento na superfície de um líquido.

A tensão superficial tem a propriedade importante de gerar pressão no interior de uma bolha. A relação entre a tensão superficial na parede e a pressão desenvolvida dentro da bolha de sabão é dada pela Lei de Laplace. Essa lei afirma que, para cada superfície da bolha, a pressão (P) é proporcional ao dobro da tensão (T) desenvolvida pelo raio (r), ou, para ambas as superfícies, P = 4T/r. Entretanto, guando somente uma interface está envolvida, como em um alvéolo esférico revestido por líquido na sua face interna, o numerador apresenta o número 2 em lugar de 4. Considerando-se dois alvéolos de diferentes tamanhos conectados através de uma via aérea comum, e com tensão superficial semelhante, pode-se depreender, com base na Lei de Laplace, que a pressão no alvéolo menor seria maior do que no alvéolo maior. Desta forma, os alvéolos menores esvaziar-se-iam nos maiores, resultando em alvéolos colapsados e ductos alveolares hiperinsuflados. Contudo isso não ocorre nos pulmões normais, pois a tensão superficial do surfactante, líquido de composição protéica e, principalmente, fosfolipídica secretado pelos pneumócitos tipo II, é consideravelmente menor do que a da solução salina que recobre as mucosas pulmonares. Dessa forma, há um equilíbrio entre os alvéolos maiores e menores, com mesma pressão mantida em seu interior

Durante a movimentação do sistema respiratório, quando ocorre fluxo de gás, um elemento adicional ao elástico precisa ser vencido pela pressão motriz: a resistência. A resistência do

sistema respiratório (Rrs) pode ser calculada dividindo-se Pres,rs por fluxo aéreo. Pres,rs representa a pressão resistiva do sistema respiratório, ou seja, a pressão necessária para vencer seus componentes resistivos. Semelhantemente à complacência, e pelas mesmas razões, a resistência do sistema respiratório se subdivide em seus componentes pulmonar e de parede.

A resistência pulmonar pode ser subdividida em dois subcomponentes: a resistência das vias aéreas (Raw), que depende do fluxo de ar no interior dos pulmões, e a resistência tecidual (Rtis), determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade (isto é, atrito) pertinente à movimentação do pulmão. A resistência das vias aéreas pode ser influenciada pela geometria da árvore traqueobrônquica, pelo volume pulmonar, pela complacência das vias aéreas, pela densidade e viscosidade do gás inspirado e pela musculatura lisa dos brônquios. A resistência tecidual depende da velocidade do deslocamento, o que é importante tanto durante a inspiração como na expiração. A resistência da parede torácica também sofre influência das perdas energéticas geradas pela viscosidade pertinente à movimentação das moléculas que constituem os tecidos da parede torácica.

Além dos componentes elásticos e resistivos, o sistema respiratório apresenta, também, propriedades viscoelásticas, tanto no tecido pulmonar quanto na parede torácica. A viscoelasticidade foi descrita a partir do comportamento de fios de seda, por Wilhem Weber em 1835. (Webber, 1835). Esse tipo de material obedece à lei da proporcionalidade entre a força aplicada e o alongamento resultante (Lei de Hooke), porém apenas por um curto período de tempo após a aplicação da força. Quando se mantém a carga por um tempo prolongado, o alongamento passa a aumentar continuamente. Este fenômeno está presente em vários tecidos animais (Dorrington, 1980).

Substâncias viscoelásticas, quando mantidas sob deformação constante, apresentam queda da tensão, chamada de relaxamento de tensão (*"stress relaxation"*), ou simplesmente, relaxamento, quando o corpo é estirado. Por outro lado, sob tensão

constante, o corpo tende a se deformar continuamente com o decorrer do tempo, fenômeno chamado "creep". Ressalte-se que esta deformação não é irreversível, mas sim reprodutível, podendo ser repetida, desde que seja precedida por um período de tempo onde o material permaneça em condições de repouso, a fim de apagar a memória do evento anterior. A viscoelasticidade permite o intercâmbio de energia (pressão) entre o componente elástico e o resistivo. Por exemplo, durante uma pausa inspiratória, a energia potencial (pressão) acumulada no componente elástico pode ser dissipada sob a forma de calor pelo componente resistivo.

1.6.2 Estudo da Mecânica Respiratória

Todas as alterações humorais e celulares da SDRA têm suas expressões na mecânica respiratória e se caracterizam por redução da complacência e aumento da resistência pulmonar (Auler e cols., 1990; Wheeler e cols., 1990; Eissa e cols., 1991; Faffe e cols., 2000).

A redução da complacência manifesta-se clinicamente pela necessidade de altas pressões de via aérea para se conseguir um dado volume inspirado. O mecanismo pode incluir o aumento da tensão superficial e a diminuição dos volumes pulmonares, como resultado de atelectasias e edema. O desenvolvimento posterior da fibrose parenquimatosa difusa reduz ainda mais a complacência pulmonar e torna mais difícil a expansão e a ventilação alveolares (Nobel e cols., 1975; Lamy e cols., 1976; Ryan e cols., 1978).

Os fatores que levam ao aumento da resistência podem ser: aumento da resistência tecidual devido à inflamação, infiltração e/ou obliteração dos condutos aéreos, edema peribrônquico e áreas de insuflação e colapso, gerando inomogeneidade no sistema (Snapper e cols., 1983; Bernard e cols., 1994; Wright & Bernard., 1989; Hudson e cols., 1995).

Na tentativa de compreender a complexidade do sistema respiratório e seus componentes (pulmão e parede torácica), além dos diversos mecanismos envolvidos durante a

respiração, foram utilizados modelos matemáticos relativamente simples, que se aproximam da realidade. Para isso, faz-se necessária a interpretação fisiológica de variáveis mensuráveis tais como fluxo, volume e pressão na abertura das vias aéreas.

O modelo mais simples compõe-se de 2 elementos, uma resistência (representada por um tubo) e uma elastância (representada por um balão) (Figura 2). Esse modelo baseia-se na assertiva de que as propriedades mecânicas do sistema respiratório independem do volume pulmonar e do fluxo, e que os fatores inerciais são desprezíveis. Considerando-se o sistema respiratório normal, esse modelo pode ser utilizado, e tornou-se tão popular que a equação a ele associada é geralmente referida como "equação de movimento do sistema respiratório". Nessa equação, P(t) = E.V(t) + R.V'(t), em qualquer instante t, E e R correspondem, respectivamente, à elastância e à resistência do sistema respiratório e P é a pressão motriz capaz de produzir volume (V) e fluxo aéreo (V'). Entretanto, apesar do modelo de compartimento único continuar sendo amplamente utilizado, não se deve aplicálo, por razões ligadas à precisão, ao estudo da mecânica em presença de doenças pulmonares, sendo necessário um modelo de dois ou mais compartimentos, no qual os compartimentos apresentem diferentes constantes de tempo, para descrever o comportamento mecânico do sistema respiratório. Além disso, essa equação de movimento não explica o decaimento lento da pressão traqueal observado após oclusão das vias aéreas ao final da inspiração (Don & Robson, 1965; Bates e cols., 1985a, 1985b), a dependência de freqüência de R e E na faixa de 0-2 Hz (Hantos e cols., 1986, 1987; Barnas e cols., 1987; Bates e cols., 1989; Brusasco e cols., 1989), bem como a presença de histerese na curva volume-pressão quase-estática em pulmões isolados (Similowski e cols., 1991).

Iniciou-se, então, o estudo da mecânica respiratória utilizando-se modelos bicompartimentais que consideravam a heterogeneidade de distribuição de gás nos pulmões (Mead, 1961) e a viscoelasticidade dos tecidos (Mount, 1955).

Na década de 60, foram descritos os primeiros modelos bicompartimentais para estudo da mecânica respiratória, que associavam a natureza multicompartimental do sistema respiratório à heterogeneidade da distribuição de gás nos pulmões (Otis e cols.,1956; Mead,1969) ou à viscoelasticidade dos tecidos torácicos (Mount, 1955).



Figura 2 - Modelo linear uni-compartimental. Representação anatômica (A), elétrica (B) e reológica (corpo de Voigt, C). R, resistência do sistema respiratório; E, elastância do sistema respiratório; V, variações de volume.

Em 1985, Bates e colaboradores representaram a proposta original de Mount na forma de um modelo físico composto por elementos elásticos representados por molas e por elementos resistivos expressos por amortecedores (Bates e cols., 1985). Os autores realizaram uma análise teórica do comportamento não homogêneo do sistema respiratório submetido a ventilação mecânica com fluxo inspiratório constante, seguida por uma oclusão súbita das vias aéreas. Imediatamente após a oclusão, ocorre uma queda rápida da pressão traqueal (Δ P1), indo do seu valor máximo (Pmax) até um ponto de inflexão (Pi), seguida por uma queda lenta (Δ P2) até atingir um platô, que corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório (Pel) (Figura 3).



Figura 3 - Modelo do método de oclusão ao final da inspiração. Registros de volume, fluxo aéreo e pressão traqueal em função do tempo.

O modelo de Bates e cols. é constituído por dois submodelos, pulmão e parede torácica, apresentando um arranjo em paralelo, uma vez que sofrem a mesma variação de volume (Figura 4). A subunidade pulmonar consiste de um amortecedor, representando a resistência das vias aéreas (Rinit,L), em paralelo com um corpo de Kelvin, que consiste de uma mola representando a elastância estática (Est,L) em paralelo com um corpo de Maxwell, caracterizado por uma mola, componente elástico (E2,L), e um amortecedor, componente resistivo (R2,L), dispostos em série. E2,L, R2,L e a constante de tempo correspondente (τ 2,L=R2,L/E2,L) estimam as propriedades viscoelásticas do pulmão. Já a subunidade da parede torácica é representada por uma resistência (Rinit,w) e pelo corpo de Kelvin, caracterizado pela elastância estática da parede torácica (Est,w) e pelos parâmetros que correspondem a viscoelasticidade (E2w, R2 e τ 2w).

Quando esse modelo é alongado (afastamento das duas barras horizontais) a uma velocidade constante (v), a carga da mola E2 aumenta com o tempo (Ti) e a velocidade do amortecedor R2 se aproxima da velocidade de alongamento (v). Assim, a força exercida

pela mola E2 aproxima-se de R2.v. Se uma manobra de "interrupção de fluxo" for realizada, o movimento relativo das duas barras horizontais cessa. Com isso, o comprimento da mola E2 diminui gradualmente até atingir seu comprimento de equilíbrio. Logo, nesse modelo, o decaimento pressórico lento (Δ P2), observado após a interrupção do fluxo, é interpretado como equivalente ao relaxamento da mola E2, resultando em dissipação calórica de energia no amortecedor R2.

Baseado no modelo de Bates e cols. (Bates e cols., 1988), a queda de pressão que ocorre imediatamente após a oclusão das vias aéreas, durante a insuflação pulmonar com fluxo constante, fornece a variação de pressão do sistema respiratório que seria obtida na ausência de desigualdades da constante de tempo e *"stress relaxation"*, ou seja, o componente viscoso ou homogêneo do sistema respiratório. A queda mais lenta da pressão, que ocorre subseqüentemente até ser atingindo o platô, reflete a pressão dissipada em decorrência da viscoelasticidade e/ou inomogeneidade do sistema, as quais são determinadas, respectivamente, pelo *"stress relaxation"* e *"pendelluft"* (Bates e cols., 1985; Bates e cols., 1988).

"Stress relaxation" pulmonar é a capacidade do pulmão de se adaptar a uma insuflação mantida, apresentando redução da pressão em função do tempo. Quando permanece sob um comprimento constante (volume), o pulmão pode alterar sua tensão com o tempo, logo, o gradiente de pressão diminui progressivamente. O *"stress relaxation"* ocorre após alterações súbitas do comprimento, *"strain"*. Nesse caso, súbito significa que o tempo necessário para o estiramento é menor do que a constante de tempo ($\tau_2 = R_2.C_2$). O *"stress relaxation"* depende do realinhamento da matriz extracelular e de perdas de energia nos tecidos pulmonares e na interface ar-líquido (Horie e cols., 1971). Já o *"pendelluft"* corresponde à transferência de um pequeno volume de gás dos compartimentos pulmonares de maior pressão para os compartimentos de menor pressão, representando o reajuste estático das diferenças regionais de volume pulmonar resultantes de desigualdades de constante de tempo (Bates e cols., 1985; Otis e cols., 1956).



Figura 4 - Modelo de molas e amortecedores para interpretação da mecânica do sistema respiratório com a técnica de interrupção do fluxo, proposto por Bates e colaboradores (Bates e cols., 1985). Pulmão e parede torácica apresentam um componente resistivo (Rinit,L e Rinit,w, respectivamente) em paralelo com um corpo de Kelvin; este composto por componente elástico (Est,L e Est,w, respectivamente) representando a elastância estática dos dois compartimentos em paralelo com um corpo de Maxwell, conjunto de amortecedor e mola em série (R2,L – E2,L, e R2,w - E2,w, respectivamente) os quais representam o comportamento viscoelástico. A distância entre as duas barras horizontais é análoga ao volume pulmonar (V) e a tensão entre elas é análoga da pressão de abertura das vias aéreas (P).

Vários fatores contribuem para o "stress relaxation" no pulmão, como o fenômeno de abertura e fechamento das vias aéreas e espaços alveolares, e as perdas de energia nos tecidos e na interface ar-líquido. As fibras de colágeno e elastina, isoladamente, apresentam pouca adaptação ao estiramento, mas o arranjo da matriz fibro-elástica apresenta contribuição significativa para este fenômeno (Horie e cols., 1971). Alguns autores ressaltam o papel da interface ar-líquido como o principal determinante do "stress relaxation" no pulmão (Horie e cols., 1971).

O comportamento não homogêneo da parede torácica não está completamente esclarecido. A parede torácica pode se comportar como um sistema de dois compartimentos, um de baixa complacência, representando pela caixa torácica e outro de complacência mais elevada, o abdome (Peslin e cols., 1975). Além disso, a pressão intrapleural não é uniforme em toda a cavidade torácica, sendo afetada pela contração do

diafragma e pela movimentação do abdome (D'Angelo e cols., 1974). As propriedades mecânicas do sistema respiratório podem sofrer influência da parede abdominal, ajudando a explicar a queda não homogênea da pressão pleural após a oclusão das vias aéreas (Zin e cols., 1989). A abertura extensa da parede abdominal leva ao aumento da elastância e resistência, provavelmente secundário à redistribuição de volumes gasosos no pulmão (Zin e cols., 1989).

O primeiro estudo em animais realizado de acordo com o proposto por Bates e cols. (Bates e cols., 1985), com subdivisão do sistema em seus componentes pulmonar e parede, foi realizado por Saldiva e cols. em 1987 (Saldiva e cols., 1987). Posteriormente, outros trabalhos também demonstraram a contribuição significativa da parede torácica para as desigualdades do sistema respiratório (Auler e cols., 1987; Kochi e cols., 1988a; Zin e cols., 1989; D'Angelo e cols., 1994; Moreira e cols., 1997; Macedo-Netto e cols., 1998; Rocco e cols., 1999), comprovando que elas podem ser atribuídas aos componentes pulmonar e de parede.

O método de oclusão das vias aéreas após insuflação com fluxo constante não permite determinar a contribuição relativa do "*pendelluft*" (desigualdades de constantes de tempo) e do "*stress relaxation*" (componente viscoelástico) para o desenvolvimento da queda lenta observada na pressão traqueal (Bates e cols., 1985; Bates e cols., 1988b; Kochi e cols., 1988). No entanto, vários autores acreditam ser a maior contribuição representada provavelmente pelo "*stress relaxation*" (Bates e cols., 1988; Kochi e cols., 1991).

No final dos anos 80, foi demonstrada, através do método de oclusão ao final da inspiração, a dependência das resistências pulmonares, de parede e do sistema respiratório em relação ao fluxo e volume (Kochi e cols., 1988a e 1988b). Em condições de isovolume, as resistências pulmonares (Rinit,L), da parede (Rinit,w) e do sistema respiratório (Rinit,rs) aumentam linearmente com o aumento do fluxo, enquanto a resistência adicional (Δ R,L; Δ R,w ou Δ R,rs), determinante da dissipação de energia

empregada para vencer o componente viscoelástico e/ou inomogêneo diminui exponencialmente. Esse comportamento se reflete na resistência pulmonar total (Rtot,L) que é maior em baixos fluxos do que em fluxos intermediários. Na situação de isofluxo, aumentando-se o volume, Rinit,L, Rinit,w e Rinit,rs decrescem, enquanto que Rtot,L, Rtot,w e Rtot,rs aumentam (D'angelo e cols., 1989; Kochi e cols., 1988a; Kochi e cols., 1988b).

Em 1988, o modelo de oclusão ao final da inspiração foi validado através de estudos experimentais utilizando-se cápsulas posicionadas em pontos diferentes da superfície pleural. Ao medir diretamente a pressão alveolar, comprovou-se ser esta homogênea através dos pulmões, apresentando pico de pressão coincidente com o ponto de inflexão (Pi) observado na curva de pressão traqueal. Logo, a pressão alveolar mostra comportamento semelhante ao encontrado na segunda fase da queda de pressão traqueal - a queda lenta. Tal observação indica que a variação de pressão responsável pela queda lenta (Δ P2) ocorre em conseqüência de um fenômeno distal às pequenas vias aéreas, ou seja, no tecido pulmonar. Logo, Δ P2 é uma manifestação do comportamento tecidual de adaptação ao stress (Bates e cols., 1988; Saldiva e cols., 1992).

Apesar de haver diversas técnicas que analisam a mecânica do sistema respiratório, nos últimos anos o método da oclusão ao final da inspiração vem sendo bastante utilizado no estudo da mecânica respiratória, tanto em animais, quanto em humanos anestesiados (Bates e cols., 1985; Auler e cols., 1987; Saldiva e cols., 1987; Kochi e cols., 1988a; D'Angelo e cols., 1989; D'Angelo e cols., 1994; Macedo-Neto e cols., 1998; Rocco e cols., 1999; Corrêa e cols., 2001 Rocco e cols., 2004; Xisto e cols., 2005; Fernandes e cols., 2006). Empregou-se este método no presente trabalho, por fornecer informações individualizadas acerca do componente pulmonar e permitir a análise de suas propriedades elástica, viscosa e viscoelástica.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Apesar das várias causas da SDRA resultarem em alterações patológicas tardiamente, caracterizadas como dano alveolar difuso (Blaisdell, 1974; Nash e cols., 1974; Lamy e cols., 1976; Bachofen e cols., 1977), várias evidências indicam que a fisiopatologia na fase precoce da SDRA pode diferir de acordo com o tipo de lesão primária: se diretamente ao epitélio alveolar, ou indiretamente, por lesão endotelial (Lamy e cols., 1976; Terashima e cols., 1996; Ware & Matthay, 2000).

A importância da lesão epitelial no desenvolvimento e recuperação da SDRA foi bem estabelecida (Pittet e cols., 1997; Wiemer-Kronish e cols., 1991) e o grau de lesão epitelial alveolar representa um fator importante para prever a evolução (Matthay e cols., 1990). O epitélio alveolar normal compõe-se de 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 SDRA acarreta várias conseqüências: (1) em condições normais, a barreira epitelial mostra-se menos permeável do que a endotelial (Wiener-Kronish e cols., 1991), sendo que a lesão epitelial pode contribuir significativamente para formação de edema alveolar; (2) a lesão de pneumócitos II interrompe o transporte normal de fluidos, dificultando a remoção de exsudato do espaço alveolar (Sznajder, 1999), bem como reduz a produção e o turnover de surfactante, contribuindo para anormalidades decorrentes da falta ou redução do mesmo (Greene e cols., 1999); (3) a perda da barreira epitelial pode levar ao choque séptico em pacientes com pneumonia bacteriana (Kurahashi e cols., 1999). Desta forma, descreveu-se que na SDRA pulmonar havia predomínio de consolidação alveolar, com preenchimento do espaço alveolar por células inflamatórias, restos celulares e edema, sendo observada na tomografia computadorizada uma redução homogênea nas áreas aeradas pulmonares com obliteração das margens broncovasculares, podendo existir broncograma aéreo (Austin e cols., 1996).

Em contrapartida, a lesão do endotélio vascular leva ao aumento da permeabilidade desta barreira, proporcionando a formação de edema intersticial, com aumento do peso do pulmão e conseqüente colapso do espaço alveolar. Além disso, quando a lesão endotelial decorre de um quadro de sepse abdominal, as alterações na mecânica da parede torácica seriam mais proeminentes, podendo acarretar atelectasias das regiões basais pulmonares devido ao aumento da pressão intra-abdominal (Gattinoni e cols., 1998).

A hipótese de que há diferenças morfo-funcionais entre a SDRA de origem direta e aquela de etiologia indireta foi confirmada em estudos experimentais e de necrópsia. No estudo de Menezes e cols (Menezes e cols., 2005) apesar do mesmo grau de comprometimento funcional encontrado em camundongos nas primeiras 24 horas da lesão, os animais submetidos à lesão pulmonar de origem direta apresentaram um processo inflamatório mais pronunciado do que aqueles submetidos à lesão indireta, embora os modelos propositadamente apresentassem o mesmo grau de comprometimento mecânico. Em modelos de SDRA causada pela administração de endotoxina de *E. coli*, a lesão direta resulta em dano alveolar caracterizado pela presença de edema, fibrina, colágeno, agregados de neutrófilos e eritrócitos no interior dos espaços alveolares, enquanto na lesão indireta ocorre predomínio de congestão microvascular, edema intersticial e dano alveolar menos grave (Brigham e cols., 1986). Hoelz e cols. (Hoelz e cols., 2001) demonstraram haver um predomínio de colapso alveolar, exsudato fibrinoso e edema da parede alveolar na SDRA direta em relação à lesão por via indireta. Gattinoni e cols. (Gattinoni e cols., 1998) evidenciaram aumento similar na elastância estática do sistema respiratório (Est,rs) tanto no grupo com SDRA direta como no da lesão indireta. No entanto, na SDRA direta a elevação da Est, rs ocorria às custas do grande aumento na elastância pulmonar (Est,L). Já na SDRA indireta, o aumento da Est,rs decorria tanto do aumento da Est,L como da Est,w.

Alguns autores sugerem que o comportamento radiológico da SDRA é diferente na dependência da sua etiologia. Goodman e cols. (Goodman e cols., 1999) analisaram prospectivamente pacientes na fase precoce da SDRA direta (n=22) e indireta (n=11), e

38

constataram predomínio de opacificação em vidro fosco (Austin e cols., 1996) simétrica e consolidação dorsal (atelectasia) na SDRA indireta, enquanto a SDRA direta tendia a ser assimétrica, com consolidações parenquimatosas densas e opacificações em vidro fosco nas mesmas proporções. Winer-Muran e cols. (Winer-Muran e cols., 1998), Desai e cols. (Desai e cols., 1999) e Rouby e cols. (Rouby e cols., 2000) encontraram resultados similares, mas não idênticos. No entanto, estes estudos apresentam algumas limitações (Gattinoni e cols., 2001). Todos utilizaram um pequeno número de pacientes. O tempo entre o início da SDRA e a realização do exame não foi uniforme e os parâmetros ventilatórios variaram de estudo para estudo. Além disso, o grupo de SDRA indireta incluiu tanto pacientes com doença abdominal como pacientes no pós-operatório de cirurgias cardíacas, no quais o colapso do lobo inferior esquerdo predomina. Finalmente, lesões diretas e indiretas podem coexistir, resultando em um padrão morfológico difícil de interpretar.

Além disso, vários autores relatam que a resposta terapêutica pode variar entre as síndromes. Suntharalingam e cols. (Suntharalingam e cols., 2001) avaliaram 81 pacientes com mesma gravidade, caracterizada pela ausência de diferença estatística na pontuação do escore APACHE II e relação PaO₂/FiO₂, e demonstraram que a SDRA direta estava relacionada a um maior tempo de ventilação mecânica (17 x 9 dias) e maior resistência ao recrutamento, em relação ao grupo de causas indiretas. Após 6 meses de acompanhamento, ambos os grupos demonstravam padrão restritivo similar ao estudo da função pulmonar. Apesar destes autores não demonstrarem um aumento estatisticamente significativo da mortalidade, o tempo de ventilação mecânica foi um indicador importante de pior prognóstico.

Pelo exposto, partindo de modelos de LPA pulmonar e extrapulmonar recentemente desenvolvidos em nosso laboratório (Menezes e cols., 2005), induzidos por LPS de *E. coli* e caracterizados por graus similares de alterações mecânicas durante as primeiras vinte e quatro horas pós-agressão, decidimos estudar, ao longo de oito semanas, a resposta morfo-funcional do pulmão após a indução da lesão pulmonar aguda direta e indireta, para melhor comprender as alterações fisiopatológicas na fase mais tardia da afecção.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivos Gerais

1 – Avaliar temporalmente os efeitos da instilação intratraqueal e intraperitoneal de LPS de *Escherichia coli*.

2 – Estabelecer um paralelo entre a evolução temporal da LPA de origem direta e indireta induzidas por LPS de *Escherichia coli*.

3 – Testar a hipótese de que alterações precoces na mecânica e histologia pulmonares
não constituem parâmetros preditores da evolução temporal do remodelamento pulmonar.

3.2 - Objetivos Específicos

Avaliar temporalmente os efeitos da instilação intratraqueal e da injeção intraperitoneal de LPS de *Escherichia coli* sobre:

- as propriedades elásticas, resistivas e viscoelásticas e/ou inomogêneas do pulmão pelo método de oclusão ao final da inspiração;
- as características morfométricas e contagem leucocitária total e diferencial no parênquima pulmonar;
- o conteúdo de fibras colágenas e do sistema elástico;
- a ultraestrutura do parênquima pulmonar;
- a expressão de metaloproteinases.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 - MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 - Grupos Experimentais:

Os animais utilizados, oriundos do biotério do Laboratório de Fisiologia da Respiração do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram cuidados conforme o guia preparado pelo Comitê de Cuidados e Uso dos Animais de Laboratório do Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos (U. S. Department of Health and Humane Services, 1985). Aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Sessenta camundongos BALB/c, pesando 25±5 g (média±DP) foram aleatoriamente divididos em quatro grupos principais: no grupo controle os animais receberam solução salina (NaCl a 0,9%) intratraquealmente (0,05 ml i.t.), constituindo o grupo Cp (n=6) ou injeção de solução salina intraperitonealmente (0,5 ml i.p.), compondo o grupo Cexp (n=6). LPS de *E. coli* (O55:B5) foi administrado por via i.t. (10 µg diluídos em solução salina, solução final com 0,05 ml) para o grupo ALIp (n=24) e por via i.p. (125 µg diluídos em solução salina, solução salina, solução final com 0,5 ml) para o grupo ALIp (n=24). Para a instilação traqueal os animais foram anestesiados com sevofluorano e uma incisão cervical de aproximadamente 1 cm foi realizada, expondo a traquéia. Após a instilação de solução salina ou LPS de *E. coli* a incisão era suturada. Os animais se recuperaram rapidamente da cirurgia.

A dose de LPS de *E. coli* foi suficiente para elevar em 1,5 vezes a elastância estática do pulmão nos grupos ALI, quando comparados com os grupos C (Menezes e cols., 2005).

Todos os animais foram submetidos à análise de mecânica e histologia pulmonares em 24 h, 1, 3 e 8 semanas após a indução da lesão (n=6 para cada tempo especificado).

Após a realização da medida da mecânica respiratória *in vivo* os animais foram sacrificados e tiveram seus pulmões removidos para análise da morfometria pulmonar,

quantificação da celularidade total e diferencial, quantificação do conteúdo de fibras colágenas e elásticas, análise por microscopia eletrônica e da expressão de MMPs.

4.2 – Mecânica Respiratória:

Nos dias acima especificados, os animais foram sedados com diazepam (1 mg i.p.), em seguida pesados (balança Filizola, modelo BR, Indústrias Filizola SA, SP, Brasil) e, então, anestesiados com pentobarbital sódico (20 mg/kg i.p.).

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos horizontalmente abduzidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada traqueotomia com introdução de jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados com trietiliodeto de galamina (2 mg/kg, através de administração intra-peritoneal).

Os camundongos foram, então, acoplados à prótese ventilatória e ventilados por um ventilador de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideu, Uruguai) com freqüência de 100 incursões respiratórias por minuto e um volume corrente (V_T) de 0,2 mL.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos a incisão cirúrgica por tesoura na linha média do abdomen justo abaixo do apêndice xifóide. A incisão foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica sobre o esterno, sendo, então, a pele do animal retirada por tração lateral. A seguir, a incisão abdominal foi estendida lateralmente, para a esquerda e para a direita, seguindo o bordo inferior das costelas, até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. As vias aéreas foram ocluídas ao final da expiração. Neste tempo foi possível visualizar o diafragma. Justo antes da perfuração do diafragma, a cânula traqueal foi conectada ao transdutor de pressão. Após a seção do

diafragma, a pressão se elevava e representava a pressão de retração elástica do pulmão. Tal valor pressórico foi aplicado ao sistema como pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de aproximadamente 2 cmH₂O, a fim de evitar o desenvolvimento de colapso pulmonar e atelectasias (Saldiva e cols, 1992; Rodrigues e cols., 1993). Após retirar o diafragma, a parede torácica foi removida em bloco por incisões longitudinais bilaterais ao nível da linha axilar anterior, em toda sua extensão, e seção transversal abaixo das clavículas.

O ventilador foi ajustado previamente para gerar, quando desejado, uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração. Foram tomados cuidados especiais na manutenção do volume ($V_T = 0,2 \text{ mL}$) 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 (Kochi e cols., 1988a, 1988b; Similowski e cols., 1989).

O tubo traqueal foi conectado a um pneumotacógrafo para pequenos animais, descrito por Mortola e Noworaj (Mortola & Noworaj, 1983), sendo o respirador acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. Este é constituído por cânula metálica com duas saídas laterais conectadas a um transdutor diferencial de pressão, Validyne MP 45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA), para medida de fluxo aéreo e volume corrente. Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a um transdutor diferencial de pressão Validyne MP 45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida da pressão traqueal (Ptr).

Uma vez que não existiram modificações abruptas no diâmetro no nosso circuito, provavelmente foram evitados erros de medida da resistência ao fluxo (Chang e Mortola., 1981; Loring e cols., 1979). O espaço morto do equipamento foi de 0,3 mL. Todos os sinais foram condicionados e amplificados num polígrafo Beckman tipo R (Beckman Instruments Schiller Park, IL, EUA). Os sinais de pressão e fluxo foram passados através de filtros Bessel de 8 polos (902LPF, Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA), convertidos de analógico para digital (DT-2801A, Data Translation, Malboro, MA, EUA) e armazenados em

computador. Todos os dados foram coletados usando o software LABDAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, Quebec, Canadá) (Figura 5).

Durante os experimentos evitou-se ao máximo a manipulação da cânula traqueal com aspirações e insuflações, para eliminar possíveis interferências sobre os parâmetros medidos.

Os parâmetros da mecânica respiratória foram determinados 24 horas, 1, 3 e 8 semanas após a instilação ou injeção de LPS ou salina, cada tempo constituindo um grupo específico de animais. A mecânica respiratória foi obtida através da captação de 15 ciclos respiratórios, pelo método da oclusão ao final da inspiração (descrito a seguir).



5 - Montagem experimental consistindo de:

- 1 Cilindro de ar comprimido.
- 2 Válvula redutora de pressão.
- 3 Ventilador de fluxo inspiratório constante composto por duas válvulas solenóides.
- 4 Pneumotacógrafo.
- 5 Peça T para medida de pressão nas vias aéreas.
- 6 Cânula traqueal.
- 7 Mesa cirúrgica.
- 8 Transdutor diferencial de pressão para medida de pressão nas vias aéreas.
- 9 Transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo.
- Polígrafo de oito canais para condicionamento e amplificação dos sinais de fluxo e pressão.
- 11 Filtros + Conversor analógico-digital de 12 bits.
- 12 Microcomputador.

4.2.1 - Método de Oclusão ao Final da Inspiração:

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

No animal com o tórax aberto, a Ptr é, na realidade, a pressão transpulmonar (PL). Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da PL até um ponto de inflexão (Pi) 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 (Pel). A diferença de pressão (Δ P1) que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial (Pmax) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta (Pi), corresponde ao componente viscoso pulmonar. A segunda variação de pressão (Δ P2), representada pela queda lenta, do Pi ao platô (Pel), reflete a pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico (*"stress relaxation"*) e/ou inomogêneo (*"pendelluft"*) do tecido pulmonar. A soma de Δ P1 e Δ P2 fornece a variação total de pressão resistiva no pulmão (Δ Ptot) (Figura 6).



Figura 6 – Método de oclusão ao final da inspiração. Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL (Δ P1) que corresponde a Pmax – Pi, pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta (Δ P2), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representado pela pressão de retração elástica pulmonar (Pel). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O. Ins, inspiração. V_T, volume corrente.

A elastância estática (Est) do pulmão foi, então, obtida dividindo-se Pel pelo volume corrente.

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 Pi e Pel. Por isso, foi feita correção de acordo com Kochi e cols. (Kochi e cols., 1988a).

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

```
\Delta P1 = Pmax - Pi\Delta P2 = Pi - Pel\Delta Ptot = \Delta P1 + \Delta P2Est = Pel / V_{T}
```

Onde:

 Δ P1 = variação de pressão relativa ao componente viscoso pulmonar

 $\Delta P2$ = variação de pressão relativa ao componente viscoelástico e/ou inomogêneo pulmonar

 Δ Ptot = variação total de pressão resistiva pulmonar

Pmax = pressão pulmonar máxima atingida

Pi = pressão pulmonar no ponto de inflexão

Pel = pressão de retração elástica pulmonar

Est = elastância estática do pulmão

 V_T = volume corrente

A resistência total do equipamento (Req), 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 = ΔP / V', a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta PxV'$. A Req, constante até fluxos de 26 mL/s (bem acima da faixa de fluxo utilizada no presente experimento), foi de 0,12 cmH₂O/mL/s. A variação de pressão determinada pelo equipamento ($\Delta Peq = Req.V'$) foi subtraída das pressões resistivas do pulmão, de tal forma que os resultados representam suas propriedades mecânicas intrínsecas

4.3 - Remoção dos Pulmões e Análise Histopatológica:

Ao término do experimento, o animal foi imediatamente sacrificado por seção da aorta abdominal e veia cava inferior, e a traquéia foi ocluída ao final da expiração com um fio de algodão. 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 secionada acima do local ligado pelo fio e, posteriormente, o esôfago foi separado do conjunto por leve tração.

Os pulmões esquerdos foram resfriados por imersão rápida em nitrogênio líquido (aproximadamente 3 min), retirados e mantidos em solução de Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) a -70° C por 24 h. Após esse período, o material foi desidratado progressivamente através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol (Nagase e cols., 1996):

- 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 a 100%, a -20°C durante 1h e, em seguida, a -4°C durante 24h.

Depois da fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 3 μm 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 as estruturas pulmonares representadas.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (*"point-couting"*) (Gundersen e cols., 1988), utilizando-se uma ocular acoplada ao microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta

(Figura 7). Foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina, em um aumento de 200x. Foi quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados. O número de leucócitos totais e diferenciais (polimorfonucleares e mononucleares) por área de tecido pulmonar foi quantificado com aumento de 1000x. Pontos que caíram sobre área de tecido e não nos espaços alveolares foram computados e divididos pelo número total de pontos. Para computar o diâmetro alveolar médio (Lm) foram contados o número de interceptos alveolares, em 20 campos aleatórios, em cada lâmina, em um aumento de 200x, sendo: Lm = Σ do comprimento dos segmentos de reta (1250 µm)/ nº de interceptos.

As lâminas também foram coradas com métodos específicos para quantificação de fibras colágenas e sistema elástico. Colágeno: Os tecidos foram corados em 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 do sistema elástico: Foi utilizado o método de resorcina-fucsina de Weigert modificado com oxidação (ORF) (Fullmer e cols., 1974), onde as fibras elásticas foram identificadas como fibras negras. Em cada animal, foram analisados 10 campos randomicamente selecionados. A quantificação foi feita por um sistema de análise e programa específico (Bioscan-Optimas 5:1, Bioscan Incorporated, Edmond, WA, EUA) em um aumento de 200x. As imagens foram geradas por um microscópio (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) conectado a uma câmera (Sony Triniton CCD, Sony, Tóquio, Japão). A área ocupada pelas fibras foi determinada por reconhecimento densitométrico digital. Com o objetivo de evitar erros de medida, as áreas ocupadas pelas fibras colágenas ou elásticas, medidas no septo alveolar, foram divididas pelo comprimento de cada septo (Negri e cols, 2000). Foram quantificadas seis lâminas de cada grupo.





4.4 - Microscopia Eletrônica de Transmissão:

Para a análise por microscopia eletrônica foram retirados dois fragmentos de parênquima pulmonar do pulmão direito de cada animal (0,2 x 0,2 x 0,2 cm). Os fragmentos foram colocados em glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4 por 2 h, sendo posteriormente lavados em solução de sacarose, constituída de 4,5 g de NaCl e 8,9 g de sacarose diluídos em 500 mL de água destilada, até a pós-fixação. A seguir, os fragmentos foram imersos em solução de tetróxido de ósmio (1% em água, contendo 133 mg de sacarose por mL) por 2 h. Após a lavagem em água bidestilada as preparações foram colocadas na geladeira em acetato de uranila 0,5% contendo 133 mg de sacarose, por um tempo 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, o tecido 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 (araldite). 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-benzildimetilamina) 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 obtidos com o ultramicrótomo Porter Blum MT2 (Sorvall, Waltham, MA, EUA). 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, selecionaram-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 nanomêtros 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 (JEOL 1010, Tóquio Japão).

4.5 – Quantificação das Metaloproteinases:

A presença de metaloproteinases 9 (MMP-9) foi analisada por imunohistoquímica, utilizando a técnica peroxidase-LSAB (Dako,Carpinteria, CA EUA). A recuperação do antígeno foi realizada por aquecimento das lâminas por 3 minutos em um banho contendo ácido cítrico (10 mM em pH 6) e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada colocando-se as lâminas em peróxido de hidrogênio a 2% por 30 minutos. As lâminas foram, então, lavadas em água deionizada e, em seguida, em salina contendo albumina bovina a 0,1%. Para evitar colorações não-específicas, as lâminas foram imersas em soro de coelhos normais a 20% por 10 minutos. A seguir, realizou-se a imersão no anticorpo primário (MMP-9 monoclonal 56-2A4, Dako, Carpinteria, CA, EUA) em uma diluição de 1:100. Posteriormente, foram novamente postas em salina e, depois, em anti IgG de coelhos (Dako, Carpinteria, CA, EUA) em uma diluição 1:400. A reação produto foi desenvolvida utilizando-se tetrahidrocloreto de diaminobenzidina. Finalmente, o tecido foi desidratado, fixado em parafina e corado com hematoxilina. Os controles positivos foram incluídos, assim como os controles negativos, sem o anticorpo primário.

Utilizando-se uma ocular acoplada ao microscópio contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta (Figura 7) quantificamos a expressão de metaloproteinases. Primeiro, em um menor aumento, selecionamos a região de maior expressão. Em seguida, em um aumento de 400x utilizou-se o sistema de retículo para quantificar a fração de pontos que se sobrepuseram a essas estruturas. Foram contados 10 campos para se obter um resultado final em percentual de estruturas coradas (Pinto e cols., 2003).

4.6 – Análise estatística:

Os valores finais foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov (com correção de Lilliefors) para avaliar a normalidade de suas distribuições. A seguir foi

aplicado o teste da mediana de Levene, para verificar a igualdade de variâncias. Se os dados satisfizessem ambos, eram aplicados testes paramétricos. No caso de qualquer um deles não ser satisfeito, testes não-paramétricos foram empregados.

Quando ambas as condições foram satisfeitas a análise de variância one-way ANOVA foi empregada e quando múltiplas comparações foram necessárias utilizou-se o teste de Bonferroni para avaliar as diferenças entre cada grupo pulmonar ou extrapulmonar comparados com seus respectivos controles. Em caso negativo, a ANOVA de Kruskal-Wallis, seguida pelo test de Dunn foi utilizada.

Uma ANOVA de dupla entrada foi utilizada para estabelecer comparações entre os grupos ALIp e ALIexp considerando a etiologia e o tempo de lesão como os dois fatores para a análise.

A relação entre parâmetros mecânicos e morfométricos foi avaliada pela correlação de Spearman.

Em todos os testes, o nível de significância foi de 5%.

A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SigmaStat 3.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA).

RESULTADOS

5-RESULTADOS

5.1. MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Os valores de volumes e fluxos utilizados durante o experimento estão mostrados na tabela 4 e não variaram significativamente entre os grupos estudados.

As diferenças entre os parâmetros de mecânica respiratória (Est, $\Delta P1$, $\Delta P2$ e $\Delta Ptot$) observadas entre os animais dos grupos que receberam salina (Cp e Cexp) e os dos grupos que receberam 10 µg ou 125 µg de LPS (ALIp e ALIexp) estão, também, representadas na Tabela 4 e na Figuras 8 e 9.

Em 24 h após a indução da lesão, todos os parâmetros de mecânica pulmonar aumentaram em mesma proporção em ALIp e ALIexp.

Os animais dos grupos que receberam 10 µg de LPS (ALIp24, ALIp1, ALIp3 e ALIp8) apresentaram aumento significativo de Δ P1, Δ P2, Δ Ptot e Est em relação aos animais do respectivo grupo controle (Cp), ao longo do período de estudo. Est apresentou aumento significativo após 24 h (70%) e uma semana de lesão (54%) em relação aos animais grupo controle (Cp). Em 3 semanas de lesão Est retornou a valores similares aos dos animais do grupo controle. Δ P1, Δ P2 e Δ Ptot permaneceram elevados até oito semanas após a indução da lesão pulmonar direta.

Na lesão extrapulmonar, todos os parâmetros de mecânica aumentaram em 24h após a agressão e retornaram a valores semelhantes aos do grupo controle (Cexp) após uma semana (ALlexp1) (Figuras 8 e 9).

Tabela 4 – Fluxo a	téreo, volume corre	ente, variações de	e pressões e elastâ	incia estática do pu	ulmão durante vent	ilação mecânica nos
animais do grupo c	controle e dos anim	nais que receberar	m lipopolissacaríde	eo de <i>E. coli</i> (LPS).		
	Fluxo	Volume	Est	ΔP1	ΔP2	APtot
Grupos	(mL/s)	(mL)	(cmH ₂ O.mL ⁻¹)	(cmH ₂ O)	(cmH ₂ O)	(cmH ₂ O)
			Intratraqueal			
Ср	1,01±0	0,20±0	22,93±0,80 a	0,24±0,08 a	0,67±0,04 a	0,91±0,78 a
ALIp24	1,00±0	0,20±0	39,03±3,55 b	0,40±0,02 b	1,05±0,08 b	1,45±0,09 b
ALIp1	1,01±0	0,20±0	35,54±1,94 b	0,37±0,22 b	1,20±0,12 b	1,57±0,13 b
ALIp3	1,00±0	0,19±0	28,06±0,74 a	0,44±0,03 b	1,05±0,73 b	1,49±0,08 b
ALIp8	1,00±0	0,20±0	22,36±1,03 a	0,38±0,02 b	0,87±0,07 b	1,25±0,07 b
			Intraperitoneal			
Cexp	1,02±0	0,19±0	25,99±1,37 a	0,29±0,03 a	0,78±0,04 a	1,07±0,07 a
ALlexp24	1,00±0	0,20±0	40,36±2,59 b	0,44±0,04 b	1,13±0,10 b	1,57±0,11 b
ALlexp1	1,02±0,01	0,20±0	30,60±1,78 a	0,39±0,04 a	0,93±0,02 a	1,32±0,04 a
ALlexp3	1,02±0	0,20±0	30,12±0,94 a	0,39±0,02 a	0,75±0,04 a	1,14±0,05 a
AL lexp8	1,01±0	0,20±0	23,58±0,77 a	0,35±0,04 a	0,59±0,03 a	0,94±0,05 a

ΔP1, ΔP2: pressões dissipadas para vencer a resistência e a viscoelasticidade/inomogeneidades pulmonares, respectivamente. ΔPtot=ΔP1+ ∆P2. Est: elastância estática do pulmão. Os valores correspondem à média de seis animais de cada grupo ± erro padrão da média (10 determinações por animal). a-b Letras iguais representam valores significativamente iguais dentro do mesmo grupo de lesão (p \leq 0,05).

59



Figura 8: Valores representam média + EPM de 6 animais em cada grupo (10 determinações por animal). Barras coloridas representam variações das pressões viscosa (P1,L), е barras brancas а pressão as para vencer os componentes viscoelásticos/inomogêneos (P2,L). A coluna inteira representa a variação de pressão total (Ptot,L). Nos grupos controle (C) solução salina foi intratraquealmente instilada (Cp, i.t. 0,05 ml) e intraperitonealmente injetada (Cexp i.p. 0,5 ml) enquanto os animais submetidos a lesão pulmonar aguda (ALI) receberam instilação intratraqueal (i.t.) e injeção intraperitoneal (i.p.) de lipopolissacarídeo de *E.coli* (10 g e 125 g, respectivamente). Os parâmetros de mecânica foram analisados 24 horas, 1, 3 e 8 semanas após a indução da lesão. a-b Letras iguais representam valores significativamente iguais dentro do mesmo grupo de lesão ($p \le 0.05$). * Significativamente diferente do respectivo grupo em ALIp.



Figura 9: Valores representam média + EPM de 6 animais em cada grupo (10 determinações por animal). Barras representam a elastância estática (Est,L) do pulmão. Nos grupos controle (C) solução salina foi intratraquealmente instilada (Cp, i.t. 0,05 ml) e intraperitonealmente injetada (Cexp i.p. 0,5 ml), enquanto os animais submetidos a lesão pulmonar aguda (ALI) receberam instilação intratraqueal (i.t.) e injeção intraperitoneal (i.p.) de lipopolissacarídeo de *E.coli* (10 g e 125 g, respectivamente). Os parâmetros de mecânica foram analisados 24 horas, 1, 3 e 8 semanas após a indução da lesão. a-b Letras iguais representam valores significativamente iguais dentro do mesmo grupo de lesão ($p \le 0,05$).

5.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

5.2.1. Análise Qualitativa

Na análise histopatológica qualitativa foi observada presença de edema perivascular apenas nos grupos estudados 24 h após a instilação de LPS de *E. coli* (ALIp, 10 µg e ALIexp 125 µg) (Figura 10). Ocorreu hiperplasia do epitélio de vias aéreas em todos os grupos ALIp, mesmo após 8 semanas de lesão (Figura 11). Nos grupos ALIp e ALIexp podemos observar espessamento dos septos alveolares e áreas de inomegeneidades no parênquima pulmonar (Figuras 12 e 13). O aumento da celularidade também pode ser visto nos grupos ALIp24 e ALIexp após 24 horas de lesão.



Figura 10: Fotomicrografias de parênquima pulmonar dos grupos de lesão pulmomar aguda (ALIp e ALIexp) 24 horas após a indução da lesão. Nota-se edema perivascular após 24 horas da indução da lesão seja ela por via direta ou indireta. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Aumento original de 400x.



Figura 11: Fotomicrografias de parênquima pulmonar dos grupos controle (Cp e Cexp), e com lesão pulmonar aguda após a instilação intratraqueal ou injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo de *E. coli* 24 horas (ALIp24 e ALIexp24), 1, 3 e 8 semanas (ALIp1, ALIexp1, ALIp3, ALIexp3, ALIp8 e ALIexp8) após a indução da lesão. Nos grupos controles observam-se vias aéreas e parênquima pulmonar com aspecto normal. Nota-se hiperplasia nas vias aéreas e espessamento dos septos alveolares em todos os grupos ALIp e em ALIexp24. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Aumento de 400x.



Figura 12: Fotomicrografias de parênquima pulmonar dos grupos controle (Cp) e com lesão pulmonar aguda (ALI) após a instilação intratraqueal de lipopolissacarídeo de *E. coli* 24 horas (ALIp24), 1, 3 e 8 semanas (ALIp1, ALIp3 e ALIp8, respectivamente) após a instilação. No grupo controle observa-se parênquima pulmonar íntegro. Nota-se maior colapso alveolar e espessamento dos septos alveolares 24 horas e uma semana após a indução da lesão. Em 8 semanas, observa-se, ainda, colapso alveolar, porém o parênquima pulmonar já se apresenta mais homogêneo, semelhante ao do grupo controle. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Aumento original de 100x.



Figura 13: Fotomicrografias de parênquima pulmonar dos grupos controle (Cexp), e com lesão pulmonar aguda (ALI) após a instilação intraperitoneal de lipopolissacarídeo de *E. coli* 24 horas (ALlexp24), 1, 3 e 8 semanas (ALlexp1, ALlexp3 e ALlexp8, respectivamente) após a injeção. No grupo controle observa-se parênquima pulmonar íntegro. Nota-se maior colapso alveolar e espessamento dos septos alveolares 24 horas após a indução da lesão. Em 1 semana observamos o parênquima pulmonar mais homogêneo, tornando-se progressivamente mais semelhante ao parênquima pulmonar do grupo controle. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Aumento original de 100x.

5.2.2. Análise Quantitativa

Os valores obtidos na análise quantitativa dos grupos controle (Cp e Cexp) e dos animais submetidos à lesão pulmonar aguda (ALIp e ALIexp) encontram-se nas tabelas 5 e 6. Os valores representam as médias de 6 lâminas por grupo, com a observação de 10 campos não coincidentes aleatoriamente escolhidos por lâmina.

A quantificação de leucócitos no septo alveolar evidenciou aumento significativo no conteúdo de polimorfonucleares (PMN) 24 horas (ALIp24 e ALIexp24) após a indução da lesão. Não houve diferenças no aumento do conteúdo de células em virtude da via de lesão (Tabela 5). Durante o curso da lesão pulmonar aguda direta, o percentual de PMN permaneceu elevado até a terceira semana após a indução da lesão (ALIp3), retornando a valores similares ao do grupo controle (Cp) em oito semanas (ALIp8) Tabela 5. Durante a lesão pulmonar de origem indireta observamos aumento no conteúdo de células polimorfonucleares no parênquima pulmonar em apenas 24 horas (ALIexp24), sendo a expressão de células semelhante a valores controle (Cexp) em uma semana (ALIexp1).

O conteúdo total de MN foi significativamente menor nos grupos submetidos à lesão pulmonar (ALIp e ALIexp), quando comparados aos grupos controles (Cp e Cexp). Não houve diferença entre os animais dos grupos que receberam LPS i.t. ou i.p. (Tabela 5).

Na análise morfométrica do parênquima pulmonar se observou uma redução na fração de alvéolos normais nos grupos que receberam 10 µg de LPS i.t. sendo esta redução mais evidenciada em 24 h (ALIp24). Observando o parênquima pulmonar após três e oito semanas de lesão pode-se notar melhora no colapso alveolar, exibindo estes tecidos maior quantidade de alvéolos normais. A fração de alvéolos normais em oito semanas de lesão pulmonar direta (ALIp8) se assemelha ao valor apresentado pelo grupo controle (Cp). A fração de alvéolos colapsados aumenta significativamente em 24 horas (1202%) e em uma semana de lesão (526%). Em oito semanas a fração de alvéolos colapsados de ALIp aproxima-se do grupo controle (Cp) (Tabela 6 e Figura 12).

Ao observamos o parênquima pulmonar dos animais submetidos à lesão pulmonar aguda extrapulmonar (ALlexp), notamos que nas primeiras 24 horas (ALlexp24) o parênquima pulmonar também apresentou aumento acentuado nas áreas de colapso alveolar (1036%) com redução significativa do percentual de alvéolos normais, quando comparado com o respectivo grupo controle (Cexp) (Tabela 6 e Figura 13). Porém, diferentemente da lesão de origem direta ao parênquima pulmomar houve recuperação mais precoce das areas de colapso alveolar, apresentando-se o parênquima pulmonar mais organizado em uma semana de lesão (ALlexp1), com normalização das áreas colapsadas (Tabela 6 e Figura 13).

Nas primeiras vinte e quatro horas de lesão os grupos que receberam LPS (ALIp24 e ALIexp24) mostraram diâmetros alveolares médios (Lm) similares e significativamente menores do que o apresentado pelo respectivo grupo controle. Tal comportamento permanece nos grupos sumetidos à lesão pulmonar aguda direta até a oitava semana de lesão (ALIp8), enquanto nos grupos submetidos à lesão pulmonar indireta (ALIexp) houve restauração do Lm após uma semana de lesão (ALIexp1) (Tabela 6).

Houve aumento no conteúdo de fibras colágenas nos grupos submetidos à lesão pulmonar aguda 24 horas após a indução da lesão (ALIp24 e ALIexp24). Entretanto, nos grupos submetidos à lesão pulmonar direta o aumento do conteúdo de fibras colágenas se manteve até a oitava semana de lesão (ALIp8), enquanto que naqueles submetidos à lesão pulmonar indireta, o conteúdo destas fibras já retorna a valores semelhantes ao do grupo controle (Cexp) na primeira semana de lesão (ALIexp1) (Tabela 7 e Figuras 14, 15 e 16).

As fibras elásticas foram evidenciadas mais tardiamente no parênquima pulmonar durante o curso da lesão pulmonar aguda direta, em uma semana, ALIp1, assim permanecendo até o final do estudo. Não houve evidência de aumento no conteúdo de fibras elásticas na lesão pulmonar indireta (Figuras 17, 18 e 19).

O aumento no conteúdo de fibras colágenas pode ser evidenciado pela maior refringência em ALIp24 e ALIexp24, ALIp1, ALIp3 e ALIp8, (Figuras 15 e 16), ao passo o

Grupos	PMN (%)	MN (%)			
Intratraqueal					
Ср	15,55±0,73	21,47±0,93			
ALIp24	30,71±2,80*	4,19±1,34*			
ALIp1	27,88±1,40*	2,92±0,58*			
ALIp3	30,80±1,62*	1,76±0,83*			
ALIp8	22,83±1,48*	2,06±0,50*			
Intratraperitoneal					
Cexp	10,95±1,50	21,25±1,10			
ALlexp24	33,10±3,55*	4,81±1,33*			
ALlexp1	15,81±1,29	1,85±0,41*			
ALlexp3	17,80±1,10	1,08±0,08*			
ALlexp8	10,93±0,73	4,65±1,19*			

Tabela 5 – Percentual de mononucleares e de polimorfonucleares por área de tecido pulmonar dos grupos controle e submetidos à lesão pulmonar aguda.

Fração de área de tecido ocupada por células. PMN = polimorfonucleares, MN = mononucleares. Os valores correspondem à média de 10 campos por lâmina de seis animais de cada grupo \pm erro padrão dos grupos: controle (Cp e Cexp) e submetidos à lesão pulmonar (ALIp e ALIexp) 24 horas, 1, 3 e 8 semanas após a indução da lesão. *Valores significativamente diferentes em relação ao respectivo grupo controle (p \leq 0,05).

	Normal (%)	Colapso (%)	Lm (μm)	
Intratraqueal				
Ср	95,80±0,15	4,20±0,15	40,99±1,20	
ALIp24	49,50±1,99*	50,50±1,90*	30,02±0,57*	
ALlp1	77,92±2,06*#	22,09±2,06*#	33,55±0,34*#	
ALlp3	85,32±0,46*#§	14,80±0,46*#§	35,47±0,90*#	
ALlp8	90,42±0,30*#§‡	9,60±0,29*#§‡	36,08±0,91*#	
Intraperitoneal				
Сехр	95,64±0,63	4,34±0,63	39,23±1,96	
ALlexp24	55,00±0,63*	45,00±0,56*	29,74±2,13*	
ALlexp1	95,00±2,47	5,00±2,46	38,60±0,48	
ALlexp3	91,99±2,48	8,01±2,48	38,26±0,24	
ALlexp8	90,42±2,54	6,76±2,25	39,48±0,23	

Tabela 6 – Morfometria do Parênquima Pulmonar.

Fração de área de alvéolos normais e colapsados e diâmetro alveolar médio (Lm) dos grupos controle (Cp e Cexp) e daqueles submetidos à lesão pulmonar (ALIp e ALIexp) 24 horas, 1, 3 e 8 semanas após a indução da lesão. Os valores correspondem à média de 10 campos por lâmina de seis animais de cada grupo \pm erro padrão. *Valores significativamente diferentes em relação ao respectivo grupo controle (p \leq 0,05). # Valores significativamente diferentes em relação ao respectivo grupo ALIp24 (p \leq 0,05). \$ Valores significativamente diferentes em relação ao respectivo grupo ALIp1 (p \leq 0,05). \$ Valores significativamente diferentes em relação ao respectivo grupo ALIp1 (p \leq 0,05). \$ Valores significativamente diferentes em relação ao respectivo grupo ALIp1 (p \leq 0,05).

	Colágeno	Elástica
	(μm²/μm)	(μm²/μm)
	Intratraqueal	
Ср	0,009 (0,005-0,009)	0,320 (0,310-0,340)
ALIp24	0,039 (0,020-0,050)*	0,350 (0,320-0,380)
ALIp1	0,035 (0,020-0,040) *	0,400 (0,370-0,450)*
ALIp3	0,030 (0,030-0,040) *	0,420 (0,380-0,480)*
ALIp8	0,040 (0,030-0,060) *	0,430 (0,380-0,470)*
	Intraperitonea	al
Cexp	0,019 (0,017-0,024)	0,345 (0,330-0,370)
ALlexp24	0,064 (0,040-0,072)*	0,375 (0,310-0,420)
ALlexp1	0,019 (0,017-0,020)	0,365 (0,258-0,410)
ALlexp3	0,021 (0,017-0,032)	0,310 (0,280-0,345)
ALlexp8	0,020 (0,016-0,036)	0,315 (0,270-0,370)

Tabela 7– Conteúdo de fibras colágenas e elásticas por comprimento de septo alveolar.

Conteúdo de fibras colágenas e elásticas (μ m²/ μ m) nos animais dos grupos controle (Cp e Cexp) e submetidos à lesão pulmonar (ALI), em 24 horas (ALIp24 e ALIexp24), uma, três e oito semanas (ALIp1, ALIexp1, ALIp3, ALIexp3, ALIp8 e ALIexp8, respectivamente). Os valores correspondem à mediana (percentis 25%-75%) de 10 campos por lâmina (6 lâminas por grupo). *Valores significativamente diferentes em relação ao respectivo grupo controle (p ≤ 0,05).



Figura 14: Gráfico de caixa do conteúdo de fibras colágenas dos animais controle (C) e submetidos à lesão pulmonar aguda (ALI) direta (p) ou indireta (exp) em 24 horas, 1, 3 e 8 semanas após a instilação intratraqueal ou injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo de *E.coli* (10 μ g e 125 μ g, respectivamente). A linha horizontal no interior da caixa representa a mediana; os limites inferior e superior da caixa indicam, respectivamente, o primeiro e o terceiro quartil, correspondendo aos elementos de posição 25% e 75% da amostra. Os segmentos de reta externos, correspondendendo às extremidades acima e abaixo da caixa central, delimitam os valores mínimo e máximo das variáveis. *Valores significativamente diferentes em relação ao respectivo grupo controle (p ≤ 0,05).



Figura 15: Fotomicrografias do parênquima pulmonar em coloração específica para quantificação de fibras colágenas (Método de Picrosirius, sob luz polarizada) dos grupos controle (Cp) e dos com lesão pulmonar aguda por instilação intratraqueal de lipopolissacarídeo de *E. coli* em 24 horas (ALIp24) 1, 3 e 8 semanas (ALIp1, ALIp3 e ALIp8) após a instilação. Os pontos brilhantes representam fibras colágenas. Observa-se aumento na refringência em 24 horas após a lesão pulmonar, que se mantém até a oitava semana pós-lesão. Aumento original: 200x.



Figura 16: Fotomicrografias do parênquima pulmonar em coloração específica para quantificação de fibras colágenas (Método de Picrosirius, sob luz polarizada) dos grupos controle (Cexp) e com lesão pulmonar aguda por injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo de *E. coli* em 24 horas (ALlexp24) 1, 3 e 8 semanas (ALlexp1, ALlexp3 e ALlexp8, respectivamente) após a indução da lesão. Os pontos brilhantes representam fibras colágenas. Observa-se aumento na refringência do parênquima em 24 horas após a lesão pulmonar. Aumento original: 200x.



Figura 17: Gráfico de caixa do conteúdo de fibras elásticas dos animais controle (C) e daqueles submetidos à lesão pulmonar aguda (ALI) direta (p) ou indireta (exp) em 24 horas, 1, 3 e 8 semanas após a instilação intra-traqueal ou injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo de *E.coli* (10 μ g e 125 μ g, respectivamente). Note que não houve variação do conteúdo de fibras elásticas no grupo exp. A linha horizontal no interior da caixa representa a mediana; os limites inferior e superior da caixa indicam, respectivamente, o primeiro e o terceiro quartil, correspondendo aos elementos de posição 25% e 75% da amostra. Os segmentos de reta externos, correspondendo às extremidades acima e abaixo da caixa central, delimitam os valores mínimo e máximo das variáveis. *Valores significativamente diferentes em relação ao respectivo grupo controle (p ≤ 0,05).



Figura 18: Fotomicrografias do parênquima pulmonar em coloração específica para quantificação de fibras elásticas (Método de Weigert resorcina-fucsina modificado por oxidação) dos grupos controle (Cp) e com lesão pulmonar aguda por instilação intratraqueal de lipopolissacarídeo de *E. coli* em 24 horas (ALIp24), 1, 3 e 8 semanas (ALIp1, ALIp3 e ALIp8, respectivamente) após a agressão. As fibras elásticas estão coradas em negro e seu conteúdo encontra-se aumentado no septo alveolar dos animais dos grupos ALIp1, ALIp3 e ALIp8, respectivamente. Aumento original: 200x.



Figura 19: Fotomicrografias do parênquima pulmonar em coloração específica para quantificação de fibras elásticas (Método de Weigert resorcina-fucsina modificado por oxidação) dos grupos controle (Cexp) e com lesão pulmonar aguda por instilação intratraqueal de lipopolissacarídeo de *E. coli* em 24 horas (ALlexp24), 1, 3 e 8 semanas (ALlexp1, ALlexp3 e ALlexp8, respectivamente) após a instilação. Note que não houve variação no conteúdo de fibras elásticas neste grupo. As fibras elásticas estão coradas em negro. Aumento original: 200x.

5.3 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A microscopia eletrônica evidenciou pneumócitos tipo I e tipo II, endotélio e epitélio alveolares preservados em ambos os grupos controles (Cp e Cexp) (Figuras 20 e 25), mantendo-se a integridade capilar e da membrana basal. A matriz extracelular apresentou seus componentes estruturais normais e o espaço alveolar encontrava-se aerado. Após 24 h de indução da lesão pulmonar direta (ALIp24), observou-se depósito de colágeno do tipo III entre os macrófagos e o fibroblasto. O pneumócito tipo II apresentou degeneração citoplasmática. Notou-se, ainda, a presença de exsudato e colapso alveolar (Figura 21). Na lesão pulmonar indireta (ALIexp24) (Figura 26) o epitélio pulmonar permanece íntegro, porém há evidências de lesão endotelial e também já se observa deposição de fibras colágenas com imagem sugestiva de colágeno do tipo III.

Em uma semana de lesão, novamente foi evidenciada a presença de fibras colágenas do tipo III ao redor do fibroblasto no septo alveolar na lesão pulmonar direta (ALIp1). Também foi observada a presença de fibras elásticas (Figura 22). Entretanto, quando observamos a ultraestrutura do tecido pulmonar submetido à lesão indireta não encontramos aumento do conteúdo de fibras elásticas, sugerindo um processo apenas fibrótico no remodelamento pulmonar deste grupo (Figura 27). Em três semanas (ALIp3), houve deposição de fibras colágenas e elásticas, com predominância de colágeno do tipo I sobre o colágeno tipo III (Figura 23), enquanto na oitava semana (ALIp8), apenas o colágeno do tipo I foi observado, juntamente com aumento do conteúdo de fibras elásticas (Figura 24). Não houve alteração do comportamento do remodelamento do parênquima pulmonar durante esse período nos grupos ALIexp3 e ALIexp8 (Figura 28 e 29).



Figura 20: Ultramicrografia do parênquima pulmonar de animal do grupo controle (Cp). São observados espaços aéreos preservados (A), pneumócitos tipo I e II íntegros (EPI e EPII). Observamos, ainda, componentes da matriz extracelular normais. * = fibras colágenas; EN = célula endotelial; MB = membrana basal; Cp= capilar. Aumento original: 5.500 X.



Figura 21: Ultramicrografia do parênquima pulmonar de animal do grupo submetido à lesão pulmonar 24 horas (ALIp24) após instilação intratraqueal de 10 μ g de lipopolissacarídeo de *E. coli.* Podemos observar colapso alveolar (A) e lesão de pneumócitos tipo II (EPII). Há deposição de fibras colágenas (*), que parecem ser do tipo III, entre o fibroblasto (F) e o macrófago (M Φ). Aumento original: 5.500 X.



Figura 22: Ultramicrografia do parênquima pulmonar de animal do grupo submetido à lesão pulmonar em 1 semana (ALIp1) após instilação intratraqueal de 10 µg de lipopolissacarídeo de *E. coli*. Observamos presença de fibras colágenas (*) que parecem ser do tipo III. Neste momento podemos observar, ainda, a presença de fibras elásticas (e) próximas ao fibroblasto (F). Aumento original: 5.500X.



Figura 23: Ultramicrografia do parênquima pulmonar de animal do grupo submetido à lesão pulmonar em 3 semanas (ALIp3) após instilação intratraqueal de 10 μ g de lipopolissacarídeo de *E. coli*. Podemos observar fibras colágenas (*) e elásticas (e). No entanto, neste momento, parece haver uma predominância de fibras colágenas do tipo I sobre as do tipo III. MB = membrana basal; A = alvéolo. Aumento original: 5.500 X.



Figura 24: Ultramicrografia do parênquima pulmonar de animal do grupo submetido à lesão pulmonar em 8 semanas (ALIp8) após instilação intratraqueal de 10 μ g de lipopolissacarídeo de *E. coli*. São observadas fibras colágenas (*) que parecem ser somente do tipo I e a presença das fibras elásticas (e) próximas ao fibroblasto (F). Aumento original: 5.500X.



Figura 25: Ultramicrografia do parênquima pulmonar de animal do grupo controle (Cexp). Observamos epitélio íntegro, capilares (Cp), neutrófilo (N) e fibroblasto (F) no septo alveolar. Aumento original: 5.500X.



Figura 26: Ultramicrografia do parênquima pulmonar de animal submetido à lesão pulmonar em 24 horas (ALIexp24) após injeção intraperitoenal de 125 μ g de lipopolissacarídeo de *E. coli*. Não observamos lesão epitelial, porém nota-se lesão endotelial. Há deposição de fibras colágenas (*) e presença de conteúdo normal de fibras elásticas, sugerindo processo fibrótico. EPII = pneumócito tipo II; EN = célula endotelial. Aumento original: 5.500 X.



Figura 27: Ultramicrografia do parênquima pulmonar de animal do grupo submetido à lesão pulmonar em 1 semana (ALlexp1) após injeção intraperitoenal de 125 μ g de lipopolissacarídeo de *E. coli*. Há presença de pequena quantidade de fibras colágenas (*), que parecem ser do tipo III, sem deposição anormal de fibras elásticas. F = fibroblasto; A = alvéolo. Aumento original: 5.500 X.



Figura 28: Ultramicrografia do parênquima pulmonar de animal do grupo submetido à lesão pulmonar em 3 semanas (ALlexp3) após injeção intraperitoenal de 125 μ g de lipopolissacarídeo de *E. coli*. Nota-se pequena quantidade de fibras colágenas (*), que parecem ser do tipo III, sem deposição anormal de fibras elásticas. F = fibroblasto; A = alvéolo. Aumento original: 5.500X.



Figura 29: Ultramicrografia do parênquima pulmonar de animal do grupo submetido à lesão pulmonar em 8 semanas (ALlexp8) após injeção intraperitoenal de 125 µg de lipopolissacarídeo de *E. coli*. Há presença de pequena quantidade de fibras colágenas (*), que parecem ser do tipo III sem deposição anormal de fibras elásticas. Neste momento os fibroblastos (F) perdem características de miofibroblasto (menor quantidade de organelas citoplasmáticas). No detalhe, citoplasma do fibroblasto (Fcy) evidenciando menor quantidade de mitocôndrias. Aumento original: 5.500 X.
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE METALOPROTEINASES

A lesão pulmonar direta (ALIp) evidenciou maior expressão de MMP-9 por neutrófilos e macrófagos em 24 horas (ALIp24) do que o grupo submetido à lesão pulmonar indireta (ALIexp). Nesta fase da lesão, houve maior expressão neutrofílica na lesão pulmonar direta (Figura 30). Após uma semana (ALIp1), a expressão de MMP-9 por neutrófilos reduz-se a valores próximos aos dos respectivos grupos controle (Cp e Cexp), porém os macrófagos apresentam sua maior expressão de MMP-9 neste momento (Figura 30). A partir da terceira semana de lesão (ALIp3 e ALIexp3) a expressão neutrofílica de MMP-9 retorna aos valores do grupo controle, porém a expressão por macrófagos permanece aumentada até a oitava semana pós-agressão (Figura 30).



Figura 30: Porcentagem de macrófagos e neutrófilos expressando metaloproteinase 9 (MMP-9) nos grupos controle (C) e naqueles submetidos à lesão pulmonar aguda (ALI) e estudados 24 horas (24), 1, 3 e 8 semanas após a indução da lesão. Em Cp e Cexp solução salina foi instilada intratraquealmente (0,05 ml, i.t.) ou injetada intraperitonealmente (0,5 ml, i.p.). Nos grupos submetidos à lesão pulmonar aguda (ALIp e ALIexp) LPS *E. coli* foi intratraquealmente instilado (10 µg) ou injetado intraperitonealmente (125 µg). a-d: Letras iguais representam valores estatisticamente iguais dentro do mesmo grupo (p \leq 0.05). § Valores relativos aos macrófagos significativamete diferentes daqueles dos neutrófilos.

5.5. CORRELAÇÃO ENTRE ACHADOS MECÂNICOS E MORFOMÉTRICOS

Considerando Cp e ALIp juntos, Est e Δ P2 se correlacionaram com percentual de alvéolos colapsados e conteúdo de células PMN. Δ P2 também se correlacionou com o conteúdo de fibras colágenas (Tabela 8).

Ao considerarmos Cexp e ALlexp juntos, observamos associação entre Est com fração de alvéolos colapsados e conteúdo de células PMN.

	Colapso	Colágeno	Elástica	PMN
	(%)	(µm²/µm)	(µm²/µm)	(%)
Intratraqueal				
Est (cmH ₂ O.mL ⁻¹)	0,87 (0,001)	0,31 (NS)	0,16 (NS)	0,72 (0,0001)
$\Delta P2$ (cmH ₂ O)	0,57 (0,02)	0,43 (0,02)	0,36 (NS)	0,60 (0,0001)
Intraperitoneal				
Est (cmH ₂ O.mL ⁻¹)	0,36 (0.048)	0,31 (NS)	NS	0,62 (0,0001)
$\Delta P2$ (cmH ₂ O)	0,32 (NS)	0,25 (NS)	NS	0,44 (0,02)

Tabela 8– Correlação entre achados morfométricos e mecânicos.

Est, $\Delta P2$: elastância estática e pressão necessária para vencer os componentes viscoelástico/inomogenêos do pulmão. Colapso: fração de área de tecido ocupada por alvéolos colapsados; Colágeno: área ocupada por fibras colágenas expressa em função do comprimento do septo interalveolar; Elástica: área ocupada por fibras elásticas expressa em função do comprimento do septo interalveolar; PMN: células polimorfonucleares. NS: estatisticamente não siginificativo. As correlações foram realizadas considerando-se conjuntamente os grupos C e ALI em cada tipo de lesão: direta (p) e indireta (exp). O valor de p está representado entre parênteses.

DISCUSSÃO

6 – Discussão

Considera-se a SDRA como uma expressão de alterações morfofuncionais do pulmão frente a agressões de etiologias múltiplas ao tecido pulmonar. Foi demonstrado que diferenças nos sítios iniciais da lesão podem acarretar diferentes mecanismos inflamatórios e diferenças significativas no curso da doença (Pelosi e cols., 2003; Rocco & Zin., 2005; Menezes e cols, 2005).

Acreditava-se que a SDRA era uma forma extrema de um espectro de lesão pulmonar provocada por mecanismos inflamatórios independentes da doença precipitante (Bachofen & Weibel, 1977; Bachofen & Weibel, 1990). Atualmente, há duas formas distintas de SDRA/LPA descritas na literatura, baseando-se nas suas diferenças principalmente quanto à etiologia (se a lesão é direta ao epitélio pulmonar ou indireta, sendo a agressão pulmonar conseqüência de uma resposta inflamatória sistêmica).

Na década passada, muitos estudos acrescentaram conhecimento acerca da fisiopatologia da SDRA. A moderna farmacologia e a terapia intensiva conseguiram alterar o curso clínico dessa complexa afecção, porém mesmo com as novas estratégias terapêuticas, a letalidade destes pacientes permanece alta nas unidades de terapia intensiva (Ware, 2005; Zimmerman e cols., 2006; Wheeler & Bernard; 2007). A sepse por gram-negativos constitui uma das causas mais letais de SDRA (40-50%) (Fein e cols., 1983).

O presente estudo objetivou avaliar a evolução temporal do remodelamento do parênquima pulmonar na lesão pulmonar aguda de origem pulmonar e extrapulmonar e estabelecer um paralelo sobre a evolução temporal do remodelamento do parênquima pulmonar na LPA direta e indireta.

6.1 Modelo Experimental

O uso de modelos animais possibilitou enormemente o entendimento da patogênese da lesão pulmonar aguda e permitiu avanços importantes no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Existe uma grande variedade de espécies animais disponíveis para a pesquisa biológica, e um ponto importante do projeto de pesquisa toca a cuidadosa seleção da espécie. Como regra geral, a espécie filogenética mais próxima à humana possui melhor correlação clínica. Porém, algumas espécies são particularmente resistentes aos efeitos das endotoxinas, e nosso experimento exigia um número considerável de animais. Por esse motivo, escolhemos camundongos BALB/c, já que a partir de um estímulo lesivo eles reproduzem características similares às da LPA humana e não necessitam de um período muito longo de vida para se encontrarem aptos para o estudo.

Foram utilizados vários modelos e substâncias para um melhor entendimento da patogênese da SDRA. Dentre eles, podemos citar aqueles produzidos por ácido oleico (Slutsky e cols., 1980; Schuster, 1998), bleomicina (Snider e cols., 1978), embolia aérea (Clack e cols., 1984), paraquat (Mantktelow, 1967; Silva e cols., 1998) e o modelo de ligadura/perfuração cecal (CLP) (Baker e cols., 1983). No entanto, modelos que utilizam endotoxinas são utilizados com maior freqüência, porque o sistema respiratório está continuamente exposto aos baixos níveis de LPS presentes no ar, incluindo poeira orgânica (Rylander e cols., 1985), poluição atmosférica (Kline e cols., 1999) e fumaça de cigarro (Hasday e cols., 1999). Ademais, a sepse por bactérias gram–negativas representa um dos principais problemas nas unidades de terapia intensiva e o mais importante fator etiológico da SDRA (Fein e cols., 1983; Bone, 1996a; Bone, 1996b; Hudson e cols., 1995; Nys e cols., 2000).

Em modelos experimentais de SDRA foram registradas diferentes respostas pulmonares quando a lesão incide diretamente no alvéolo, como no caso de instilação intratraqueal de endotoxina (Terashima e cols., 1994; Tasaka e cols., 1996; Menezes e

cols., 2005) ou quando os pulmões são lesados indiretamente por substâncias tóxicas injetadas intravenosa ou intraperitonealmente (Seindenfeld e cols., 1986; Menezes e cols., 2005). A primeira estrutura atingida, após uma lesão de causa direta, é o epitélio pulmonar. Esse fato também foi comprovado em nosso estudo, na análise por microscopia eletrônica, pois na SDRA pulmonar nota-se lesão do epitélio alveolar, início da fragmentação da membrana basal e lesão e citólise do PII, levando a uma destruição dos corpos lamelares (Figura 21).

Quando a agressão se faz por via indireta, as lesões ao epitélio pulmonar são disparadas por mediadores inflamatórios liberados fora do pulmão e que atingem o tecido pulmonar pela circulação sanguínea (como na pancreatite, por exemplo). Neste caso, a célula endotelial é o alvo principal da lesão e a ativação da cascata inflamatória produz aumento na permeabilidade da barreira endotelial (Pelosi, 2000). Então, na lesão por via indireta, a alteração patológica mostra congestão microvascular e edema intersticial, podendo, também, haver edema alveolar em menor proporção. No presente estudo, ocorreu agressão ao endotélio vinte quatro horas após lesão pulmonar induzida por injeção intraperitoneal de LPS de *E. coli* (Figura 26).

A instilação intratraqueal ou injeção intraperitoneal foram adotadas em nosso trabalho como modelos experimentais por mimetizar as alterações fisiopatológicas da SDRA de origem direta e de origem indireta, respectivamente. Com este modelo, conseguimos promover aumento de celularidade, edema perivascular sem hemorragia alveolar, colapso alveolar com espessamento dos septos, modificações dos componentes da matriz extracelular além das alterações nos parâmetros da mecânica respiratória. As doses utilizadas de LPS de *E. coli* (10 µg e 125 µg) para induzir as lesões foram previamente estudadas em nosso laboratório (Menezes e cols., 2005). Tais doses reproduzem as alterações mecânicas e morfológicas encontradas na SDRA, sem, entretanto, serem letais, haja vista a temporalidade do nosso estudo. Logo, os animais desenvolveram a lesão pulmonar após receberem instilação de LPS, sobrevivendo até a

oitava semana. Neste período os animais foram mantidos em gaiolas microisoladoras, sendo devidamente cuidados em nosso biotério. Além disso, essas doses foram ajustadas para produzirem lesões com grau de comprometimento funcional semelhantes entre as diferentes vias de administração nas primeiras 24 horas de evolução (Menezes e cols., 2005), nos permitindo, assim, a comparação temporal da doença entre os grupos (Tabela 4).

6.2 Mecânica Respiratória e Histologia Pulmonar

Atualmente, sabe-se da importância da estratificação da SDRA em pulmonar ou extrapulmonar, visto que os distintos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas duas condições podem conduzir a síndrome de modo funcionalmente diverso (Goodman e cols., 1999; Pelosi, 1999; Gattinoni e cols., 2001; Verbrugge e cols., 2007).

Dentre os métodos para análise de mecânica respiratória optamos pelo método de oclusão rápida ao final da inspiração com fluxos e volumes constantes. Essa escolha foi realizada pela possibilidade de medir as propriedades elásticas, resistivas e viscoelásticas do sistema respiratório e seus componentes (Bates e cols., 1985 e 1988; Kochi e cols., 1988a e 1988b; Broseghini e cols, 1988; Similowski e cols., 1989; Pesenti e cols, 1991; Eissa e cols, 1991; Saldiva e cols., 1992; Tantucci e cols, 1992; Ranieri e cols, 1994; Pelosi e cols, 1995).

Em nosso experimento, não obtivemos os valores referentes à mecânica da parede torácica e do sistema respiratório, pois realizamos a retirada da porção anterior do gradil costal. Logo, avaliamos os componentes resistivo, elástico e viscoelástico pulmonares. Em função dessa cirurgia, utilizamos um nível de aproximadamente 2 cmH₂O de PEEP (Saldiva e cols., 1992), para evitar o colapso dos espaços aéreos e manter a capacidade residual funcional. Ademais, os efeitos da PEEP se tornam menos acentuados na presença de tórax aberto, uma vez que, na ausência da parede torácica não há compressão da veia

cava nem da aorta pela pressão positiva com conseqüente redução do retorno venoso e do débito cardíaco.

A influência das variações de volume e fluxo sobre os parâmetros da mecânica respiratória, já previamente constatada em pacientes com SDRA (Auler e cols., 1990; Eissa e cols., 1991), foi evitada em nossos experimentos com a utilização de volume e fluxo estatisticamente iguais entre os grupos, não contribuindo, assim, para as diferenças encontradas nos parâmetros respiratórios (Tabela 4).

Historicamente, tem sido utilizada a medida da complacência do sistema respiratório para monitorar e acompanhar a progressão da lesão pulmonar na SDRA, sendo que esse dado da mecânica respiratória faz parte do *score* prognóstico da síndrome (Murray e cols., 1988).

Em nosso experimento, houve incremento em proporção similar do componente elástico do pulmão (Est) 24 horas após a indução da lesão nos grupos ALIp e ALIexp (Figura 9 e Tabela 4). Wright & Bernard (1989) foram os primeiros a estudar exclusivamente SDRA pelo método de oclusão ao final da inspiração e encontraram uma complacência estática pulmonar bastante reduzida. Essa alteração pode ser explicada por um aumento no percentual de alvéolos colapsados, espessamento dos septos alveolares e por elevação no percentual de células polimorfonucleares na análise histopatológica e morfométrica (Figuras 12 e 13 e Tabelas 5 e 6). Em uma semana de lesão, entretanto, o valor da elastância estática já retorna a valores semelhantes ao do grupo controle na lesão extrapulmonar (ALIexp1), porém permanecendo, ainda, elevado na agressão pulmonar direta (ALIp1) (Figura 9 e Tabela 4). Rojas e cols (Rojas e cols., 2005) encontraram resultado semelhante em estudo utilizando endotoxina em camundongos submetidos a lesão pulmonar aguda através da injeção intraperitoneal de LPS de *E. coli*.

Em 3 e 8 semanas após a indução da lesão (ALIp3, ALIexp3, ALIp8 e ALIexp8) não detectamos mais o aumento da elastância estática. Ao observarmos o parênquima pulmonar dos animais neste período da lesão constatamos maior semelhança com o tecido

pulmonar dos animais dos grupos controle, ou seja, uma tendência à redução no percentual de alvéolos colapsados e um maior número de alvéolos normais (Figuras 12 e 13 e Tabela 6). Nossos resultados são semelhantes àqueles encontrados por Rocco e cols., utilizando modelo de lesão pulmonar aguda induzida pela injeção intraperitoneal de paraquat (Rocco e cols., 2004). Neste estudo, a mecânica respiratória, avaliada em 1, 3 e 8 semanas após a indução da lesão, evidenciou apenas alteração de elastância estática (Est) na primeira semana após a agressão ao parênquima pulmonar, refletindo um reparo da lesão endotelial (Rocco e cols., 2004). No presente estudo não foi encontrada lesão dos PII no grupo ALIexp, porém a presença da lesão endotelial promove o extravasamento de líquido para o espaço alveolar, levando à perda das propriedades tenso-ativas do surfactante e conseqüente colapso alveolar (Ware & Matthay, 2000). Assim, explica-se o aumento na elastância observado na primeira semana de lesão.

O componente viscoelástico (Δ P2) aumentou significativamente em relação ao grupo controle (Cp) em todos os grupos com LPA de origem direta (ALIp24, ALIp1, ALIp3 e ALIp8) (Figura 8). Esse aumento pode ser atribuído à maior expressão de colapso alveolar em todos os grupos ALIp (Tabela 6), espessamento dos septos alveolares, aumento no número de células inflamatórias no tecido pulmonar e, ainda, deposição de fibras colágenas e elásticas, componentes da matriz extracelular (Tabelas 5-8). Não há na literatura outro estudo no qual as alterações mecânicas e morfométricas da ALIp tenham sido avaliadas em experimento crônico. Ao analisarmos o componente viscoelástico (Δ P2) dos animais do grupo ALIexp, entretanto, observamos que apenas em 24 horas (ALIexp24) houve aumento significativo deste parâmetro de mecânica em relação ao respectivo grupo controle (Cexp) (Figura 8). Tais dados são compatíveis com aqueles encontrados na análise morfométrica, de celularidade e dos componetes de matriz extracelular dos grupos ALIexp (Tabelas 5-8), como também anteriormente relatado (Rocco e cols., 2001, 2003, 2004; Menezes e cols., 2005). Não houve diferenças funcionais entre os grupos ALIp e ALIexp em 24 horas, em concordância com Menezes e cols. (2005), que utilizaram o

mesmo modelo aqui empregado.

A análise da morfometria dos grupos submetidos à lesão pulmonar demonstrou, ainda, um percentual elevado da fração de área de colapso em ALIp24 e ALIexp24 (1102% e 936%) em relação aos respectivos grupos controle (Tabela 6), como também encontrado por Menezes e cols. (2005). Em ALIp o colapso alveolar permanece superior àquele encontrado no grupo controle (Cp) até a oitava semana da lesão, porém apresenta uma redução progressiva, tendendo a valores próximos aos do grupo controle em ALIp8 (Tabela 6). Em ALlexp, após uma semana do estabelecimento da injúria pulmonar, houve normalização das áreas de atelectasia, apresentando-se o parênquima pulmonar evolutivamente mais próximo ao do grupo controle (Cexp) (Tabela 6 e Figura 13). Em outro relato, com ALlexp induzida por paraquat (7 mg/kg) o colapso alveolar atingiu seu valor máximo em uma semana e, a partir de então, decresceu até a oitava sem, todavia, retornar ao controle (Rocco e cols., 2004). Tal diferença entre os dois achados pode ser devida à dosagem, ao agente agressor e às diferentes espécies utilizadas. Por fim, em um estudo em necrópsia Hoelz e cols. (2001) encontraram maior grau de colapso alveolar em ALIp, enquanto Gattinoni e cols. (2001) relatam que na ALIp o recrutamento alveolar faz-me mais difícil do que na ALlexp.

A atelectasia pulmonar, sabidamente, afeta os valores de elastância, pois é necessária maior pressão para a manutenção de um mesmo volume corrente. Essa correlação entre colapso alveolar, no âmbito da inomogeneidade pulmonar, e alterações dos parâmetros viscoelásticos foi bem definida por Bates e cols. (1988b) ao realizarem a medida da pressão alveolar em cães com tórax aberto. Em modelos experimentais (Faffe e cols., 2000; Contador e cols., 2003) essa associação foi claramente encontrada. Complementarmente a ventilação é inomogênea na SDRA, com diferentes constantes de tempo, acarretando aumento de $\Delta P2$ (Auler e cols., 1990; Eissa e cols., 1991, 1992).

O aumento em Δ P1 (Figura 8), reflete aumento na resistência das vias aéreas (Bates e cols., 1988b; Saldiva e cols., 1992) e esteve presente em todos os grupos

submetidos à lesão pulmonar aguda de origem direta (ALIp) e apenas nas primeiras 24 horas nos grupos submetidos a LPA extrapulmonar (ALIexp). Podemos observar a hiperplasia do epitélio das vias aéreas na análise histopatológica (Figura 11). Nas análises morfométrica e histopatológica, foram observadas grandes vias aéreas constrictas, hiperplásicas, e normais em lâminas pertencentes ao mesmo animal. Isto é, há possivelmente aumento da resistência ao fluxo aéreo, produzindo a alteração no componente resistivo (Δ P1) dos grupos ALIp e ALIexp24 (Saldiva e cols., 1992).

Os aumentos significativos em Δ P1 e em Δ P2 elevaram a Δ Ptot, como já encontrado na literatura (Broseghini e cols., 1988; Tantucci e cols., 1992).

6.3 Remodelamento da matriz extracelular

O estudo da matriz extracelular e suas modificações tem recebido grande atenção ultimamente, em uma tentativa de correlacionar as alterações nos seus componentes com achados patológicos na mecânica pulmonar. A fase fibroproliferativa da SDRA já foi descrita, por alguns autores, como uma resposta precoce à lesão pulmonar (Chesnutt e cols., 1997; Armstrong e cols., 1999; Marshall e cols., 2000; Rocco e cols., 2001; Negri e cols., 2002; Rocco e cols., 2003; Pelosi e cols., 2007), e não tardia, como relatado durante muito tempo, ou seja, o processo de reparo se inicia juntamente com o momento de instalação da lesão (Tomashefski, 2000).

As fibras colágenas e elásticas são importantes constituintes da matriz extracelular e têm sido amplamente estudadas, por influenciarem diretamente as propriedades elásticas do tecido pulmonar. Armstrong e cols. (1999) demonstraram aumento de pró-peptídeo Cterminal, como um marcador da síntese de colágeno tipo I, em pacientes no primeiro dia de SDRA. Marshall e cols. (2000) e Chesnutt e cols. (1997) relataram grande atividade mitogênica e aumento nos níveis de pró-colágeno III no fluido do lavado bronco alveolar (BALF) de pacientes com 24 horas de diagnóstico de SDRA, reforçando a hipótese de que a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno são eventos precoces. Também observamos um aumento no conteúdo de fibras colágenas já em 24 horas após a indução da lesão pulmonar aguda (ALIp e ALIexp) (Tabela 7 e Figuras 14-16) (Rocco e cols., 2001, 2003, 2004; Menezes, 2005), com predominância de colágeno tipo III, como sugerido pela microscopia eletrônica (Figuras 21 e 26). A presença de fibroblastos próximos às fibras colágenas no tecido pulmonar, neste momento da lesão, reforça a hipótese de que o processo reparativo inicia-se precocemente (Rocco e cols., 2001, 2003; Menezes, 2005).

Após uma semana de lesão a quantidade de fibras colágenas no tecido pulmonar dos animais do grupo ALlexp retornou a níveis idênticos ao controle e ai se manteve até o final do experimento (Figuras 14 e 16). Em modelo de ALlexp por injeção intraperitoneal de paraquat, o conteúdo de colágeno permaneceu elevado até 8 semanas pós-agressão, mas há diferenças experimentais entre aquele estudo (Rocco e cols., 2004) e o nosso, o que não permite a comparação direta entre os resultados. Na lesão pulmonar direta, diferentemente, houve deposição aumentada destas fibras na matriz extracelular, que se manteve por 8 semanas. As ultramicrografias dos animais deste grupo a partir da primeira semana de lesão (ALIp1) evidenciam presença de fibras colágenas, cuja imagem sugere ser colágeno predominante do tipo III (Figura 22). A partir da terceira semana, o colágeno III começa a ser gradualmente substituído por colágeno tipo I (Figuras 23 e 24), de forma que em oito semanas apenas notou-se colágeno I, segundo a microscopia eletrônica (Figura 24). A substituição do colágeno tipo III por tipo I, que é mais rígido, pode ser responsável por problemas nas trocas gasosas e alterações fisiológicas, que ocorrem nos estágios tardios de fibrose (Entzian e cols., 1990).

O reparo e o remodelamento do tecido pulmonar são conseqüências da agressão ao tecido pulmonar e da cascata inflamatória envolvida no processo de lesão e parecem depender do alvo primário da agressão (Meduri, 1996; Towes, 1999; Ingbar, 2000; Negri e cols., 2002). Menezes e cols. (2005) demonstraram uma reposta inflamatória mais pronunciada na lesão pulmonar direta do que aquela evidenciada na lesão pulmonar indireta, ambas induzidas pela administração intratraqueal ou intraperitoenal, respectivamente, de LPS de *E. coli*. Na lesão extrapulmonar os mediadores inflamatórios liberados na circulação sistêmica levam a aumento da permeabilidade da barreira endotelial, edema intersticial e proporcionam o recrutamento de células inflamatórias (Ware & Matthay, 2000). Fibroblastos também migram e se proliferam no local (Ware & Matthay, 2000). Dentro das paredes alveolares estas células depositam componentes da matriz extracelular, entre eles o colágeno (Geiser, 2003). Durante o curso da lesão pulmonar direta, a perda da integridade epitelial e a lesão dos PII contribuem para o edema e colapso alveolares, desnaturação do surfactante e, a partir deste momento, se inicia o mecanismo de fibrose.

A literatura descreve que quantidades elevadas de colágeno tipo III no BALF de pacientes com SDRA refletem a síntese de colágeno e, portanto, o BALF pode ser usado para se obter um marcador do processo reparativo (Armstrong e cols., 1999; Marshal e cols., 2000). No presente estudo, houve aumento no conteúdo de fibras colágenas (Tabela 7) durante todo o curso da lesão pulmonar direta e somente nas primeiras 24 horas da lesão pulmonar indireta (ALIexp24), sugerindo fortemente que a formação precoce de colágeno não representa um bom marcador para predizer a evolução do remodelamento do parênquima pulmonar na SDRA.

O sistema elástico, importante componente da matriz extracelular, tem um papel significativo na manutenção da patência das vias aéreas, bem como do recolhimento elástico do pulmão. Devido às suas propriedades mecânicas, as fibras elásticas contribuem para o recolhimento elástico do pulmão, restaurando a sua configuração de repouso depois de finda a inspiração (Cotran e cols., 1999). Assim, a deposição elástica pode ter um papel importante na compreensão das alterações das propriedades mecânicas de pacientes com SDRA.

Os mecanismos que estimulam o processo fibrótico parecem diferir daqueles responsáveis pelo disparo da fibroelastogênese (Rocco e cols., 2004). A reativação da síntese de fibras elásticas é, de fato, uma resposta proporcional ao estímulo lesivo (Negri e

cols., 2000). Rocco e cols. (2001) em estudo em modelo animal de SDRA grave, evidenciaram maior deposição de fibras elásticas no processo de reparo 24 horas após o início da lesão, devendo-se isso à deposição predominante de fibras oxitalânicas. Em nossos resultados a elastose foi observada apenas a partir de uma semana de lesão durante o curso da lesão pulmonar direta, perdurando por até oito semanas (Tabela 7 e Figura 17). Podemos atribuir esta diferença ao fato do nosso modelo representar uma SDRA moderada, visto a necessidade de sobrevivência dos animais por até oito semanas. Dessa forma, confirma-se que o processo de fibroelastose — e não somente fibrose ocorre em nosso modelo de LPA. Quando a agressão ao epitélio pulmonar se dá por via indireta (ALlexp) não se evidencia deposição de fibras elásticas (Tabela 7 e Figura 18). Provavelmente a ausência de lesão direta ao epitélio pulmonar não estimula a produção de fibras elásticas pelos fibroblastos (Adamson e cols., 1988). Neste contexto, em modelo de ALlexp por paraquat, não houve aumento do conteúdo de fibras elásticas até 8 semanas após a agressão (Rocco e cols., 2004); por outro lado, a dose de paraguat capaz de induzir agudamente (24 h) a elastose corresponde a 25 mg/kg de peso corporal (Rocco e cols., 2001).

O envolvimento das metaloproteinases (MMP) e seus inibidores (TIMP) no remodelamento tecidual tem sido estudado em diversas afecções, tais como fibrose pulmonar, SDRA, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e adenocarcinoma (Parks e cols., 2001; Suga e cols., 2000; Winkler e cols., 2002; Choe e cols., 2003; Atkinson e cols., 2003; Lanchou e cols., 2003; Pinto e cols., 2003; Elkington e cols., 2006; Greenlee e cols., 2007; Pelosi e cols., 2007) e constitui um evento de suma importância na degradação dos componentes da MEC. Dentre as diversas MMPs encontradas, a MMP-9 tem sido bastante estudada nas doenças pulmonares, estando sua atuação vinculada às células inflamatórias (Lagente e cols., 2005).

Experimentos em modelos animais, submetendo ratos a ventilação com altos volumes, evidenciaram aumento na concentração de MMP-9 e MMP-2 e demostraram que o pré-tratamento com seus inibidores atenuava a lesão pulmonar (Winkler e cols., 2002).

Estudo com camundongos demonstrou que estes desenvolvem fibrose pulmonar após dez semanas sob exposição ao LPS. Neste modelo, a fibrogênese foi associada ao aumento da atividade de MMP-2 e MMP-9 (Corbel e cols, 1998). Pesquisas com pulmões humanos, *in vitro*, demonstraram aumento na atividade de macrófagos alveolares após exposição a LPS, resultando em um aumento na liberação de MMPs: primariamente MMP-9, assim como TIMP-1. Neutrófilos também produzem MMPs e as armazenam em vesículas, em presença de citocinas inflamatórias (Suga e cols., 2000; Winkler e cols., 2002).

Ricou e cols., em 1996, evidenciaram uma relação entre o número de neutrófilos no BALF e a produção de MMP-9 em pacientes com SDRA, sugerindo que estas eram originadas nos neutrófilos do espaço alveolar. A alta concentração de metaloproteinases no BALF pode levar à degradação da MEC, vista na fase precoce da LPA e da SDRA (Ricou e cols., 1996).

Juntos, estes dados sugerem que as MMPs se apresentam em quantidades elevadas em indivíduos com SDRA, bem como nos modelos animais, sugerindo que a sua inibição poderia representar um mecanismo útil para controlar seus efeitos agudos no tecido pulmonar. No entanto, *in vivo*, o aumento no conteúdo de metaloproteinases nos pulmões de pacientes com SDRA não reflete necessariamente degradação de colágeno (Armstrong e cols., 1999). A literatura sugere papel de regulação do *turnover* da matriz extracelular pulmonar para as MMPs (Winkler e cols., 2002). Análises de tecidos pulmonares de indivíduos portadores de fibrose pulmonar idiopática evidenciam baixas concentrações de MMPs. Naqueles pacientes, que após tratamento com corticoesteróide referiam melhora da função pulmonar, as amostras teciduais apresentavam concentrações 2 a 3 vezes maior de MMPs (Selman e cols., 2001). Dessa forma, parece que a repressão

da produção de MMPs pelos fibroblastos é uma fator importante para o desenvolvimento de fibrose.

Em nosso estudo, a expressão de MMPs foi qualitativamente similar nos grupos ALIp e ALIexp. Todavia, aquele mostrou valores mais elevados do que este. Observamos um aumento na concentração de MMP-9 já nas primeiras 24 horas após a indução da lesão, juntamente com aumento do conteúdo de fibras colágenas, dados estes consistentes com a literatura. Entretanto, de grande significância foi observar que, neste momento da lesão, a maior expressão de metaloproteinases se deu por neutrófilos (Figura 30). Diversos estudos demonstrando a atuação das MMPs na patogênese da fibrose pulmonar evidenciam presença destas colagenases concomitante ao recrutamento de neutrófilos no BALF (Ohbayashi, 2002; Atkinson e cols., 2003; Lagente e cols., 2005; Elkington e cols., 2006).

Sabe-se que o neutrófilo é a primeira célula inflamatória a ser recrutada após a lesão, ou seja, em 24 horas de reação inflamatória aguda já está bem estabelecida a presença de neutrófilos, cujos lisossomas são ricos em metaloproteinases, o que justifica a sua maior expressão de MMP-9 na fase aguda da lesão, em nosso trabalho (Figura 30). O macrófago, entretanto, assume diversas funções no mecanismo inflamatório, podendo atuar como célula apresentadora de antígeno e também exercendo função fagocitária. Sua atuação, entretanto se inicia após 48 horas, eventualmente até em uma semana de lesão (Ware & Matthay, 2000).

Em uma semana de lesão, a expressão de metaloproteinases por neutrófilos diminui, mantendo este comportamento decrescente até a oitava semana de lesão. Contrastando com a expressão de MMP-9 por neutrófilos, a atuação dos macrófagos se inicia mais tardiamente, sendo sua maior expressão em uma semana de lesão. A partir deste momento, assume também, diminuição progressiva de sua atividade (Figura 30).

Enquanto as MMPs são classicamente descritas como proteases que degradam proteínas da MEC, alguns autores acatam sua participação no desencadear da fibrose,

envolvendo uma produção excessiva de componentes da MEC por hiperproliferação de células mesenquimais (Pinto e cols., 2003; Lagente e cols., 2005; La Rocca e cols., 2007). Dados recentes sugerem que, além da atuação no *turnover* da MEC, as MMPs promovem a liberação de fatores de crescimento e citocinas partícipes da fibrogênese, tais como TGF- β e TNF- α (Winkler e cols., 2002). Diante de tais conhecimentos, no presente estudo a MMP-9 provavelmente contribuiu para o desenvolvimento mais importante de fibrose nos animais submetidos à lesão pulmonar direta. A partir de uma semana após a lesão pulmonar, tanto direta como indireta, observamos uma redução na expressão de MMPs e um equilíbrio na deposição/degradação de componentes da MEC. Entretanto, acredita-se que o principal fator determinante para o processo fibrogênico seja o equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores (TIMPs) (Lagente e cols., 2005).

6.4 Conclusões:

 A instilação intratraqueal de 10 µg de LPS de *E. coli* acarreta alterações resistivas e viscoelásticas no período de 24 h em camundongos BALB/c. Tais alterações perduram por até oito semanas após induzida a lesão.

A instilação intratraqueal de 10 µg de LPS de *E. coli* acarreta alterações do componente elástico do pulmão em camundongos BALB/c. Em três semanas de lesão pulmonar aguda as alterações da elastância se atenuam e não são observadas em oito semanas de lesão.

 O aumento na elastância pulmonar na ALIp se deve principalmente ao aumento no colapso alveolar encontrado nos animais submetidos à lesão pulmonar aguda e, também, à elevação no percentual de células polimorfonucleares.

 A instilação intratraqueal de 10 µg de LPS de *E. coli*, em camundongos BALB/c, levou ao aumento no conteúdo de fibras colágenas em 24 horas de lesão e de fibras elásticas em uma semana. Ambas permanceram elevadas até oito semanas de LPA.

 A instilação intraperitoneal de 125 µg de LPS de *E. coli* acarreta alterações resistivas, elásticas e viscoelásticas no período de 24 h em camundongos BALB/c. Tais alterações não são mais encontradas em uma semana após induzida a lesão.

 O aumento na elastância pulmonar na ALlexp se deve principalmente ao aumento no colapso alveolar encontrado nos animais submetidos à lesão pulmonar aguda e, também, à elevação no percentual de células polimorfonucleares.

A instilação intraperitoneal de 125 µg de LPS de *E. coli*, em camundongos BALB/c, levou ao aumento no conteúdo de fibras colágenas em 24 horas de lesão. Tais alterações não são mais encontradas em uma semana após induzida a lesão. Fibras elásticas não foram encontradas neste tipo de lesão.

• O aumento na expressão de metaloproteinase-9 em 24 h evidencia o início do remodelamento do tecido pulmonar na fase precoce da lesão em ALIp e ALIexp.

A expressão de metaloproteinases se dá prontamente por neutrófilos e mais

tardiamente por macrófagos e também diminui mais precocemente naqueles nas duas vias de lesão.

 Este modelo foi capaz de reproduzir as alterações morfofuncionais encontradas na SDRA e evidenciou o início precoce do remodelamento da matriz extracelular pulmonar.
Mostrou, também, que algumas destas alterações podem perdurar por oito semanas.

 Alterações funcionais persistentes não predizem a evolução do remodelamento do parênquima pulmonar e o conteúdo de fibras colágenas na fase precoce da lesão não confere um bom marcador do processo reparativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson IY; Youg L; Bowden DH. Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis. **Am J Repir Crit Care Med**; 1988 130: 377-83.

Alberts B; Bray D; Lewis J; Raff M; Roberts K; Watson J. **The Cell**. 3^a ed. São Paulo Ed.: Artes Médicas Sul, 1994 8:823-31.

Armstrong L; Thickett DR; Mansell JP; Lonescu M; Hoyle E; Billinghurst RC; Poole AR; Millar AB. Changes in collagen turnover in early acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**; 1999 160:1910-5.

Artigas A; Bernard GR; Carlet J; Dreyfuss D; Gattinoni L; Hudson L; Lamy M; Marini JJ; Matthay MA; Pinsky MR; Spragg R; Suter PM. The American-European Consensus Conference on ADRS, part 2. **Am J Respir Crit Care Med**; 1998 157:1332-47.

Ashbaugh DG; Bigelow DB; Petty TL; Levine BE. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**; 1967 2:319-23.

Atkinson JJ; Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. **Am J Resp Cell Mol Biol**; 2003 28:12-24.

Auler JO Jr; Zin WA; Caldeira MP; Cardoso WV; Saldiva PH. Pre- and postoperative inspiratory mechanics in ischemic and valvular heart disease. **Chest**; 1987 92:984-90.

Auler Jr JOC; Saldiva PHN; Martins MA; Carvalho CRR; Negri EM; Hoelz C; Zin WA. Flow and volume dependence of respiratory system mechanics during constant flow ventilation in normal subjects and in adult respiratory distress syndrome. **Crit Care Med**; 1990 18:1080-6.

Austin JHM; Müller NL; Friedman PJ; Hansell DM; Naidich DP; Remy-Jardin M; Webb WR; Zerhouni EA. Glossary of terms for CT of the lungs: recommendations of the nomenclature committee of the Fleischner Society. **Radiology**; 1996 200:327-3.

Bachofen M; Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. **Am Rev Respir Dis**; 1977 116:589-615.

Bai KJ; Spicer AP; Mascarenhas MM; Yu L; Ochoa CD; Garg HG; Quinn DA. The role of hyaluronan synthase 3 in ventilator-induced lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**; 2005 172: 92-98.

Baker CC; Chaudry IH; Gaines HO; Baue AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation puncture model. **Surgery**; 1983 94:331-5.

Barnas GM; Yoshino K; Loring SH; Mead J. Impedance and relative displacement of relaxed chest wall up to 4 Hz. **J Appl Physiol**; 1987 62:71-81.

Bates JH; Baconnier P; Milic-Emili J. A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. **J Appl Physiol**; 1988a 64:2204-14.

Bates JH; Ludwig MS; Sly PD; Brown K; Martin JG; Fredberg JJ. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. **J Appl Physiol**; 1988b 65:408-14.

Bates JHT; Abe T; Romero PV; Soto J. Measurement of alveolar pressure in closedchest dogs during flow interruption. **J Appl Physiol**; 1989a 67:488-92.

Bates JHT; Decramer M; Chartrand D; Zin WA; Böddener A; Milic-Emili J. Volumetime profile during relaxed expiration in the normal dog. **J Appl Physiol**; 1985a 59:732-7.

Bates JHT; Rossi A; Milic-Emili J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. **J Appl Physiol**; 1985b 58:1840-8.

Baughman RP; Gunther KL; Rashkin MC; Keeton DA; Pattishall EN. Changes in the inflammatory response of the lung during acute respiratory distress syndrome: prognostic indicators. **Am J Respir Crit Care Med**; 1996 154:76-81.

Bellingan GJ. Resolution of inflammation and repair. **Eur Respir Monograph**; 2002 7:70-82.

Bensadoun ES; Burke AK; Hogg JC; Roberts CR. Proteoglycan deposition in pulmonary fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**; 1996 154:1819-27.

Bernard GR; Artigas A; Bringham KL; Carlet J; Falke K; Hudson L; Lamy M; Legall JR; Morris A; Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS – Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. **Am J Respir Crit Care Med**; 1994 149: 818-24.

Berthiaume Y; Folkesson HG; Matthay MA. Lung edema clearance: 20 years of progress. Invited Review: Alveolar edema fluid clearance in the injured lung. **J Appl Physiol**; 2002 93:2207-13.

Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Cell Biology**; 1995 7:728-35.

Bitterman PB. Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury. **Am J Med**; 1992 6A:39s-43s.

Blaisdell FW. Pathophysiology of the respiratory distress syndrome. **Arch Surg**; 1974 108:44-9.

Bone RC. Gram-positive organisms and sepsis. Arch Intern Med; 1994 154:26-34.

Bone RC. The sepsis syndrome – Definition and general approach to management. **Clin Chest Med**; 1996a 17: 175-80.

Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. **Crit Care Med**; 1996b 24:162-72.

Borok Z; Verkman AS. Lung edema clearance: 20 years of progress: invited review: Role of aquaporin water channels in fluid transport in lung and airways. **J Appl Physiol**; 2002 93:2199-206.

Brigham K; Woolverton W; Glake L. Increased sheep lung vascular permeability caused by Pseudomonas bacteremia. **J Clin Invest**; 1974 792-804.

Brigham KL; Meyrick B. Endotoxin and lung injury. **Am Rev Respir Dis**; 1986 133:913-27.

Broseghini C; Brandolese R; Poggi R; Polese G; Manzin E; Milic-Emili J; Rossi A. Respiratory resistance and intrinsic positive end-expiratory pressure (PEEP) in patients with the adult respiratory distress syndrome (ARDS). **Eur Respir J**; 1988 1:726-31.

Brown SB; Savill J. Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. **J Immunol**; 1999 162:480-5.

Brusasco V; Warner DO; Beck KC; Rodarte JR; Rehder K. Partitioning of pulmonary resistance in dogs: effect of tidal volume and frequency. **J Appl Physiol**; 1989 66:1190-6.

Callister MEJ; Evans TW. Pulmonary versus extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: different diseases or just a useful concept? **Crit Care Med**; 2002 8:21-5.

Cantor JO; Cerreta JM; Keller S; Turino GM.Modulation of airspace enlargement in elastase-induced emphysema by intratracheal instillment of hyaluronidase and hyaluronic acid. **Experimental Lung Research**; 1995 21: 423-436.

Carney DE; McCann UG; Schiller HJ; Gatto LA; Steinberg J; Picone AL; Nieman G F. Metalloproteinase inhibition prevents acute respiratory distress syndrome. **J Surg Res**; 2001 99:245-52.

Chang HK; Mortola JP. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurement. **J Appl Physiol**; 1981 51:218-25.

Chen C; Fang X; Chang C. Surfactant and corticosteroid effects on lung function in a rat model of acute lung injury. **Crit Care Med**; 2001 29:2169-75.

Chesnutt AN; Matthay MA; Tibayan FA; Clark JG. Early detection of type III procolagen peptide in acute lung injury. Pathogenetic and prognostic significance. **Am J Respir Crit Care Med**; 1997 156:840-5.

Chilosi M, Poletti V, Zamo A, Lestani M, Montagna L, Piccoli P, Pedron S, Bertaso M, Scarpa A, Murer B, Cancellieri A, Maestro R, Semenzato G, Doglioni C. Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. **Am J Pathol**; 2003 162(5):1495-502.

Choe KH; Taraseviciene-Stewart L; Scerbavicius R; Gera L; Tuder RM; Voelkel N F. Methylprednisolone causes matrix metalloproteinases-dependent emphysema in adults rats. **Am J Respir Crit Care Med**; 2003 1516-21.

Clack MC; Flick MR. Permeability pulmonary edema caused by venous air embolism. **Am Rev Respir Dis**; 1984 129:633-5.

Compernolle V; Brusselmans K; Acker T; Hoet P; Tjwa M; Beck H; Plaisance S; Dor Y; Keshet E; Lupu F; Nemery B; Dewerchin M; Van Veldhoven P; Plate K; Moons L; Collen D; Carmeliet P. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. **Nature Medicine**; 2002 8:702-10.

Contador RS; Chagas PSC; Vasconcellos FP; Feijóo M; Faffe DS; Rocco PRM; Zin WA. Evaluation of respiratory mechanics and lung histology in a model of atelectasis. **Respir Physiol Neurobiol**; 2003 137:61-8.

Corbel M; Boichot E; Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. **Braz J Med Biol Res**; 2000 33:749-54.

Corbel M; Lagente V; Théret N; Germain N; Clément B; Boichot E. Comparative effects of betamethasone, cyclosporin and nedocromil sodium in acute pulmonary inflammation and metalloproteinase activities in bronchoalveolar lavage fluid from mice exposed to pipolysaccharide. **Pulm Pharmacol Ther**; 1999 12:165-71.

Corbel M; Théret N; Caulet-Maugendre S; Germain N; Lagente V; Clément B; Boichot E. Increased activity of matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase) and neutrophil recruitment following chronic exposure to endotoxin in the mouse. **Am J Respir Crit Care Med**; 1998 157:A567.

Corrêa FCF; Ciminelli PB; Falcão H; Alcântara BJC; Contador R; Medeiros AS; Zin WA; Rocco PRM. Respiratory mechanics and lung histology in normal rats anesthetized with sevoflurane. **J Appl Physiol**; 2001 91:803-10.

Cotran RS; Kumar V; Collins T; Robbins SL; **Pathology basis of disease**. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999 89-112.

D'Angelo E; Calderini E; Torri G; Robatto FM; Bono D; Milic-Emili J. Respiratory mechanics in anesthetized paralyzed humans: effects of flow, volume, and time. **J Appl Physiol**; 1989 67:2556-64.

D'Angelo E; Prandi E; Tavola M; Calderini E; Milic-Emili J. Chest wall interrupter resistance in anesthetized paralyzed humans. **J Appl Physiol**; 1994 77:883-7.

Delclaux C; Rezaiguia-Delclaux S; Delacourt C; Brun-Buisson C; Lafuma C; Harf A. Alveolar neutrophils in endotoxin-induced and bacteria-induced acute lung injury in rats. **Am J Physiol**; 1997 14:L104- 12.

Desai SR; Wells AU; Rubens MB; Evans TW; Hansell DM. Acute respiratory distress syndrome: CT abnormalities at long-term follow up. **Radiology**; 1999 210:29-35.

Don HF; Robson JG. The mechanics of the respiratory system during anesthesia. **Anesthesiology**; 1965 26:168-78.

Dorrington KL. The theory of viscoelasticity in biomaterials. **Symp. Soc. Exp. Biol.** 1980; 34:289-314.

Douglas IS; Diaz Del Valle F; Winn RA; Voelkel NF. Beta-catenin in the fibroproliferative response to acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**; 2006 34:274-85.

Dudek SM; Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. **J Appl Physiol**; 2001 91:1487-1500.

Ebihara T; Venkatesan N; Tanaka R; Ludwig M S. Changes in extracellular matrix and tissue viscoelasticity in bleomycin-induced lung fibrosis. Temporal aspects. **Am J Respir Crit Care Med**; 2000 162:1569-76.

Eissa NT; Ranieri VM; Corbeil C; Chassé M; Robatto FM; Baridy J; Milic-Emili J. Analysis of behavior of the respiratory system in ARDS patients: effects of flows, volume and time. **J Appl Physiol**; 1991 70:2719-29.

Eissa NT; Ranieri VM; Corbeil C; Chassé M; Baridy J; Milic-Emili J. Effect of PEEP on the mechanics of the respiratory system in ARDS patients. **J Appl Physiol**; 1992 73:1728-35.

Elkington PTG; Friedland JS. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. **Thorax**; 2006 61:259-66.

Entzian P; Hückstädt A; Kreipe H; Barth J. Determination of serum concentrations of type III procolagen peptide in mechanically ventilated patients. **Am Rev Respir Dis**; 1990 142:1079-82.

Faffe DS; Seidll VR; Chagas PS; Gonçalves de Moraes VL; Capelozzi VL; Rocco PRM; Zin WA. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. **Eur Respir J**; 2000 15:85-91.

Fein AM; Calalang-Colucci MG. Sepsis and septic shock. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. **Crit Care Clin**; 2000 16:289-317.

Fein AM; Lippmann M; Hotzman H; <u>Eliraz A</u>, <u>Goldberg SK</u>. The risk factors, incidence, and prognosis of ARDS following septicemia. **Chest**; 1983 1: 40-2.

Feltis BA; Jechorek RP; Erlandsen SL. Bacterial translocation and lipopolysaccharide-induced mortality in genetically macrophage-deficient op/op mice. **Shock**;1994 2:29-33.

Fernandes FC; Ferreira HC; Cagido VR; Carvalho GM; Pereira LS; Faffe DS; Zin WA; Rocco PR. Effects of dexmedetomidine on respiratory mechanics and control of breathing in normal rats. **Respir Physiol Neurobiol**; 2006 154(3):342-50.

Fowler AA; Hamman RF; Good JT; Benson KN; Baird M; Eberle DJ; Petty TL; Hyers TM. Adult respiratory distress syndrome: risks with common predispositions. **Ann Intern Med**; 1983 589-93.

Fox-Dewhurst R; Alberts MK; Kajikawa O; Caldewell E; Johnson MC; Skerret JS; Goodman RB; Ruzinski JT; Wong VA; Chi EY; Martin TR. Pulmonary and systemic inflammatory responses in rabbits with gram-negative pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**; 1997 155:2030-40.

Fukuda Y; Ishizaki M; Masuda Y; Kawanami O; Masugi Y. The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. **Am J Pathol**; 1987 126:171-82.

Fullmer HM; Sheetz JH; Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers: a review. **J Oral Pathol**; 1974 3:291-316

Galen BT. Cellular alterations in fibroproliferative lung disease. **Chest**; 1999 116:112-6.

Gattinoni L; Bombino P; Pelosi P; Lissoni A; Pesenti A; Fumagalli R; Tagliabue M. Lung structure and function in different stages of severe adult respiratory distress syndrome. **JAMA**; 1994 271:1722-7

Gattinoni L; Caironi P; Pelosi P; Goodman LR. What has computed tomography taught us about the acute respiratory distress syndrome? **Am J Respir Crit Care Med**; 2001 164:1701-11.

Gattinoni L; Pelosi P; Suter PM; Pedoto A; Vercesi P; Lissoni A. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**; 1998 158:3-11.

Geiser T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury – a translation approach. **Swiss Medical Weekly**; 2003 133:405-11.

Gerli R; Ibba L; Fruschelli C. A fibrillar elastic apparatus around lymph capillaries. **Anat Embryol (Berl)**; 1990 181:281-6.

Go LL; Healey PJ; Watkins SC. The effect of endotoxin on intestinal mucosal permeability to bacteria in vivo. **Arch Surg**; 1995 130:53-8.

Goldstein RH. Control of type I collagen formation in the lung. **Am J Physiol**; 1991 5:L29-40.

Goodman BR; Strieter RM; Martin DP; Steinberg KP; Milberg JA; Maunder RJ; Kunkel SL; Walz A; Hudson LD; Martin TR. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**; 1996 154:602-11.

Goodman LR; Fumagalli R; Tagliabue P; Tagliabue M; Ferrario M; Gattinoni L; Pesenti A. Adult respiratory distress syndrome due to pulmonary and extrapulmonary causes: CT, clinical, and functional correlation. **Radiology**; 1999 213:545-52.

Greene KE; Wright JR; Steinberg KP; Ruzinski JT; Caldwell E; Wong WB; Hull W; Whitsett JA; Akino T; Kuroki Y; Nagae H; Hudson LD; Martin TR. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. **Am J Respir Crit Care Med**; 1999 160:1843-50.

Greenlee KJ; Werb Z; Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious and multifaceted. **Physiol Rev**; 2007 87: 69-98.

Groshaus HE; Manocha S; Walley KR; Russel JA. Mechanisms of beta-receptor stimulation-induced improvement of acute lung injury and pulmonary edema. **Crit Care**; 2004 8:234-42.

Gundersen HJ; Bendtsen TF; Korbo L; Marcussen N; Moller A; Nielsen K; Nyengaard JR; Pakkenberg B; Sorensen FB; Vesterby A. Some new, simple and

efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**; 1988 96: 379-94.

Handel TM; Johnson Z; Crown SE; Lau EK; Proudfoot AE. Regulation of protein function by glycosaminoglycans as exemplified bychemokines. **Annual Review of Biochemistry**; 2005 74: 385-410.

Hantos Z; Daroczy B; Suki B; Galgoczy G; Csendes T. Forced oscillatory impedance of the respiratory system at low frequencies. **J Appl Physiol**; 1986 60:123-32.

Hantos Z; Daroczy B; Suki B; Nagy S. Low frequency respiratory mechanical impedance in the rat. **J Appl Physiol**; 1987 63:36-43.

Hasday JD; Bascom R; Costa JJ; Fitzgerald BS; Dubin W. Bacterial endotoxin s an active component of cigarette smoke. **Chest**; 1999 115: 829-35.

Hildebrandt J. Pressure-volume data of cat lung interpreted by a plastoelastic, linear viscoelastic model. **J Appl Physiol**; 1970; 28: 365-72.

Hoelz C; Negri EM; Lichtenfels AJ; Conceição GM; Barbas CS; Saldiva PH, Capelozzi VL. Morphometric differences in pulmonary lesions in primary and secondary ARDS. A preliminary study in autopsies. **Pathol Res Pract**; 2001 197: 521-30.

Homma S, Jones R, Qvist J, Zapol WM, Reid L. Pulmonary vascular lesions in the adult respiratory distress syndrome caused by inhalation of zinc chloride smoke: a morphometric study. **Hum Pathol**; 1992 23(1):45-50.

Horie T; Hildebrandt J. Dynamic compliance, limit cycles, and static equilibria of excised cat lung. **J Appl Physiol**; 1971 31:423-30.

Hudson LD; Milberg JA; Anardirdi D; Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**; 1995 151:293-301.

Idell S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. **Crit Care Med**; 2003 31:S213-20.

Ingbar DH. Mechanisms of repair and remodeling following acute lung injury. **Clin Chest Med**; 2000 21:589-616.

Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. **FASEB J**; 2006 20:811–827.

Johnson Z; Proudfoot AE; Handel TM. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. **Cytokine & Growth Factor Reviews**; 2005 16:625-636.

Kaner RJ; Ladetto JV; Singh R; Fukuda N; Matthat MA; Crystal RG. Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema. **Am J Resp Cell Mol Biol**; 2000 22:657-64.

Kline JN; Codwen JD; Hunninghake GW; Schutte BC; Watt JL; Wohlford CL; Powers LS; Jones MP; Schwarts DA. Variable airway responsiveness to inhaled lipopolysaccharide. **Am J Respir Crit Care Med**; 1999 160:297-303.

Kochi T; Okubo S; Zin WA; Milic-Emili J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects on flow and volume. **J Appl Physiol**; 1988b 64:2636-46.

Kochi T; Okubo S; Zin WA; Milic-Emili J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J Appl Physiol**; 1988a 64:441-50.

Kollef MH; Schuster D. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**; 1995 332:27-37.

Kurahashi K; Kajikawa O; Sawa T; Ohara M; Gropper MA; Frank DW; Martin TR; Wiener-Kronish JP. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **J Clin Invest**; 1999 104:743-50.

Laffon M; Jayr C; Barbry P; Wang Y; Folkesson HG; Pittet JF; Clereci C; Matthay MA. Lidocaine induces a reversible decrease in alveolar epithelial fluid clearance in rats. **Anesthesiology**; 2002 96:392-9.

La Rocca G; Anzalone R; Magno F; Farina F; Cappello F; Zummo G. Cigarette smoke exposure inhibits extracellular MMP-2 (gelatinase A) activity in human lung fibroblasts. **Respir Res**; 2007 8:23-39.

Lagente V; Manoury B; Nénan S; Le Quément C; Martin-Chouly C; Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammaion and remodeling. **Braz J Med Biol Res**; 2005 38:1251-30.

Lamy M; Fallat RJ; Koeniger E; Dietrich HP; Ratliff JL; Eberhart RC; Tucker HJ; Hill JD. Pathologic features and mechanisms of hipoxemia in adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**; 1976 114:267-84.

Lanchou J; Corbel M; Tanguy M; Germain N; Boichot E; Theret N; Clement B; Lagente V; Malledant Y. Imbalance between matrix metalloproteinses (MMP-9 and MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in acute respiratoryu distress syndrome patients. **Crit Care Med**; 2003 31:536-542.

Li X; Shu R; Filippatos G; Uhal BD. Apoptosis in lung injury and remodeling. **J Appl Physiol**; 2004 97:1535-42.

Li XY; Donaldson K; MacNee W. Lipopolysaccharide-induced alveolar epithelial permeability: The role of nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med**; 1998 157:1027-33.

Lin LH; Hopf HW. Paradigm of the injury-repair continuum during critical illness. **Crit Care Med**; 2003 31(8 Suppl):S493-5.

Lopez-Aguilar J; Romero PV. Effect of elastase pretreatment on rat lung strip induced constriction. **Respir Physiol**; 1998 113:239-46.

Loring SH; Elliot EA; Drazen JM. Kinetic energy loss and convective acceleration in respiratory resistance measurements. **Lung**; 1979 156:33-42.

Lu Q; Harrington EO; Rounds S. Apoptosis and lung injury. **Keio J Med**; 2005 54:184-9.

Luh S; Chiang C. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. **J Zhejiang University**; 2007 8:60-69.

Macedo-Neto A; Santos LV; Menezes SL; Paiva DSS; Rocco PRM; Zin WA. Respiratory mechanics after prosthetic reconstruction of the chest wall in normal rats. **Chest**;1998 113: 1667-72.

Mantktelow BW. The loss of pulmonary surfactant in paraquat poisoning: a model for the study of respiratory distress syndrome. **Brit J Exp Pathol**; 1967 48:366-9.

Marshall RP; Belligan G; Webb S; Puddicombe A; Goldsack N; McAnult RJ; Laurent GJ. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. **Am J Respir Crit Care Med**; 2000 162:1783-8.

Martin TR; Nakamura M; Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. **Crit Care Med**; 2003 31:S184-8.

Matthay MA. Acute Lung Injury. Chest; 1999 116:119S-26S.

Matthay MA. Alveolar fluid clearance in patients with ARDS. Does it make difference? **Chest**; 2002 122:S340-S3.

Matthay MA; Calfee CS. Nonventilatory Treatments for Acute Lung Injury and ARDS. **Chest**; 2007 131:913–920.

Matthay MA; Wierner-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. **Am Rev Respir Dis**; 1990 142:1250-7.

Matute-Bello G; Liles WC; Li RF; Steinberg KP; Ruzinski JT; Jonas M; Chi EY; Hudson LD; Martin TR. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syundrome. **Am J Respir Crit Care Med**; 1997 156:1969-77.

McIntyre RCJr; Pulido EJ; Bensard DD; Shames BD; Abraham E. Thirty years of clinical trials in acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med**; 2000 28:3314-31.

Mead J. Contribution of compliance of airway to frequency-dependent behavior of lungs. **J Appl Physiol**; 1969 26:670-3.

Mead J. Mechanical properties of lungs. Physiol Rev; 1961 41:281-330.

Meduri GU. Levels of evidence for the pharmacologic effectiveness of prolonged methylprednisolone treatment in unresolving ARDS. **Chest**; 1999 116: 116-8.

Meduri GU. The role of the host defence response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiological correlations and response to glucocorticoid treatment. **Eur Respir J**; 1996 9:2650-70.

Meduri GU; Belenchia JM; Estes RJ; Wunderink RG; Torky ME; Leeper KVJr. Fibroproliferative phase of ARDS – Clinical finding and effects of corticosteroids. **Chest**; 1991 100: 943-52.

Menezes SL; Bozza PT; Castro Faria Neto HC; Laranjeira AP; Negri EM; Capelozzi VL; Zin WA; Rocco PRM. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. **J Appl Physiol**; 2005 98:1778-83.

Meyrick B; Brigham KL. Acute effects of Escherichia coli endotoxin on the pulmonary microcirculation of anesthetized sheep structure: function relationships. **Lab Invest**; 1983 48:458-70.

Meyrick BO. Endotoxin-mediated pulmonary endothelial cell injury. **Fed Proc**; 1986a 45:19-24.

Milbergh JA; Daris DR; Steinberg KP; Hudson LP. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): 1983-1993. **JAMA**; 1995 306-9.

Milic-Emili J. Ventilation. In: Regional differences in the lung. New York, N.Y., Academy Press Inc., 1977. Editado por West, J.B. Cap. 4, p. 167-99.

Miserocchi G; Negrini D; Passi A; De Luca G. Development of lung edema: interstitial fluid dynamics and molecular structure. **News Physiol Sci**; 2001 16:66-71.

Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**; 1996 20:15-27.

Moreira LM; Gobbi C; Feijó M; Rocco PRM; Zin WA. Mechanical and morphometry after pneumoperitoneum in normal rats. **Eur Respir J**; 1997 10: 1321-26.

Mortola JP; Noworaj JA. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. **J Appl Physiol**; 1983 55:250-3.

Mount LE. The ventilation flow - resistance and compliance of rat lungs. **J Appl Physiol**; 1955 127:157-67.

Mura M; Dos Santos CC; Stewart D; Liu M. Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. **J Appl Physiol**; 2004 97:1605-17.

Murray JF; Mattahy MA; Luce JM; Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**; 1988 138:720-3.

Nagase T; Dallaire MJ; Ludwig MS. Airway and tissue behavior during early response in sensitized rats: role of 5-HT and LTD4. **J Appl Physiol**; 1996 80:583-90.

Nash G; Foley FD; Langlinais PD. Pulmonary interstitial edema and hyaline membranes in adult burn patients. Electron microscopic observations. **Hum Pathol**; 1974 5:149-60.

Negri EM; Hoelz C; Barbas CS; Montes GS; Saldiva PH; Capelozzi VL. Acute remodeling of parenchyma in pulmonary and extrapulmonary ARDS. An autopsy study of collagen-elastic system fibers. **Pathol Res Pract**; 2002 198:355-61.
Negri EM; Montes GS; Saldiva PHN; Capelozzi VL. Architectural remodelling in acute and chronic interstitial lung disease: fibrosis or fibroelastosis? **Histopathology**; 2000 37:393-401.

Nobel WH; Kay JC; Obdrzalck J. Lung mechanics in hypervolemic pulmonary edema. **J Appl Physiol**; 1975 38, 681-5.

Nys M; Ledoux D; Canivet JL; De Mol P; Lamy M; Damas P. Correlation between endotoxin level and bacterial count in bronchoalveolar laavage fluid of ventilated patients. **Crit Care Med**; 2000 28:2825-30.

Ohbayashi H. Matrix metalloproteinases in lung diseases. **Curren Protein Pept Sci**; 2002 3:1-13.

Orfanos SE; Mavrommati I; Korovesi I; Roussos C. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. **Int Care Med**; 2004 30:1702-14.

Otis AB; Mckerrow CB; Bartlett RA; Mead J; Mcilroy MB; Selverstone NJ; Rodford EP. Mechanical factors in distribution of pulmonary ventilation. **J Appl Physiol**; 1956 8:427-43.

Panos RJ; Rubin JS; Csaky KG; Aaronson SA; Mason RJ. Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparinbinding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. **J Clin Invest**; 1993 92:969-77.

Pardo A; Selman M. Matrix metalloproteinases and lung injury. **Braz J Med Biol Res**; 1996 29:1109-15.

Park WY; Goodman RB; Steinberg KP; Ruzinski JT; Li FR; Park DR; Pugin J; Skerrett SJ; Hudson LD; Martin TR. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**; 2001 164:1896-903.

Parks WC; Shapiro S. Matrix metalloproteinases in lung biology. **Respir Res**; 2001 2:10-9.

Parsons PE; Worthen GS; Moore EE; Tate RM; Henson PM. The association of circulating endotoxin with the development of the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**; 1989 140:294-301.

Pelosi P. What about primary and secondary ARDS. **Minerva Anest**; 2000 66:779-85.

Pelosi P; Cadringher P; Bottino N; Panigada M; Carrieri F; Riva E; Lissoni A; Gattinoni L. Sigh in acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**; 1999b 159:872-80.

Pelosi P; Cereda M; Foti G; Giacomini M; Pesenti A. Alterations of lung and chest wall mechanics in patients with acute lung injury: effects of positive end-expiratory pressure. **Am J Respir Crit Care Med**; 1995 152:531-7.

Pelosi P; D'Onofrio D; Chiumello D; Paolo S; Chiara G; Capelozzi VL; Barbas CSV; Chiaranda M; Gattinoni L. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different. **Eur Respir J**; 2003 22:S42 48s-56s.

Pelosi P; Rocco PRM; Negrini D; Passi A. The extracelluar matrix of the lung and its role in edema formation. **An Acad Bras Cienc**; 2007 79:285-297.

Pesenti A; Pelosi P; Rossi N; Virtuani A; Brazzi L; Rossi A. The effects of positive end-expiratory pressure on respiratory resistance in patients with the adult respiratory distress syndrome and in normal anesthetized subjects. **Am Rev Respir Dis**; 1991 144:101-7.

Peslin R, Papon J, Duviver C, Richalet J. Frequency response of the chest: modeling and parameter estimation. **J Appl Physiol**; 1975 39:523-34.

Piantadosi CA; Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome. **Ann Intern Med**; 2004 141:460-470.

Pinto CA; Carvalho PEO; Antonângelo L; Garippo A; Silva AGP; Soares F; Younes R; Beyrutti R; Takagaki TY; Saldiva PHN; Vollmer RT; Capelozzi V. Morphometric

evaluation of tumor matrix metalloproteinase 9 predicts survival after surgical resection in adenocarcinoma of the lung. **Clin Cancer Res**; 2003 9: 3098-104.

Pittet JF; MacKersie RC; Martin TR; Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. **Am J Respir Crit Care Med**; 1997 155:1187-205.

Pugin J; Verghese G; Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med**; 1999 27:304-15.

Pugin J; Widmer MC; Kossodo S; Liang CM; Preas HL; Suffredini AF. Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. **Am J Respir Cell Moll Biol**; 1999 20:458-64.

Raghow R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. **FASEB J**; 1994 8:823-31.

Raghow R; Lurie S; Sayer JM; Kang AH. Profiles of steady state levels of messenger RNAs coding for type I procollagen, elastin and fibronectin in hamster lungs undergoing bleomycin—induced interstitial pulmonary fibrosis. **J Clin Invest**; 1985 76:1733-9.

Ranieri VM; Giuliani R; Fiore T; Dambrosio M; Milic-Emili J. Volume-pressure curve of the respiratory sustem predicts effects os PEEP in ARDS: "Occlusion" versus "constant flow" tecnique. **Am J Crit Care Med**; 1994 149:19-27.

Ricou B; Nicod L; Lacraz S; Welgus HG; Suter PM; Dayer J. Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**; 1996 154:346-52.

Rocco PR; Facchinetti LD; Ferreira HC; Negri EM; Capelozzi VL; Faffe DS; Zin WA. Time course of respiratory mechanics and pulmonary structural remodelling in acute lung injury. **Respir Physiol Neurobiol**; 2004 143(1):49-61.

Rocco PRM; Fonseca SMS; Pinto AP; Medeiros AS; Zin WA. Effects of prosthetic reconstruction of the abdominal wall on respiratory mechanics in rats. **Respir Physiol**; 1999 115:35-43.

Rocco PRM; Negri EM; Kurtz PM; Vasconcellos FP; Silva GH; Capelozzi VL; Romero PV; Zin WA. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**; 2001 164:1067-71.

Rocco PRM; Souza AB; Faffe DS; Pássaro CP; Santos FB; Negri EM; Lima JGM; Contador RS; Capelozzi VL; Zin WA. Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. **Am J Resp Crit Care Med**; 2003 168:677-84.

Rocco PRM; Zin WA. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different? **Curr Opin Crit Care**; 2005 11:10-7.

Rodarte JR; Rehder K. Dynamics of respiration. In: Macklem, P.T.; Mead, J. (Eds). Handbook of Physiology. The respiratory system. Mechanics of breathing. The American Physiological Society, Bethesda, vol. 3, cap. 10, 131-144, 1986.

Rodrigues AC; Moreira LF; de Souza CL; Pettersen PC; Saldiva PH; Zin WA. Effects of thoracotomy on respiratory system, lung, and chest wall mechanics. **Chest**; 1993 104(6):1882-6.

Rojas M; Woods CR; Mora SL; Xu J; Brigham KL. Endotoxin induced lung injury in mice: structural, functional and biochemical responses. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**; 2005 288:L333-L41.

Rouby JJ; Puybasset L; Cluzel P; Richeocoeur J; Lu Q; Grenier P. Regional distribution of gas and tissue in acute respiratory distress syndrome. **Intensive Care Med**; 2000 26:1046-56.

Ryan SF; Barret CR; Lavietes MH; Bell AL; Rochester DF. Volume-pressure and morphometric observations after acute alveolar injury in the dog from N-nitroso-N-methylurethane. **Am Rev Respir Dis**; 1978 118:735-45.

Rylander R; Hanglind, P; Lundholm, M. Endotoxin in cotton dust and respiratory function decrement among cotton works in an experimental cardroom. **Am Rev Respir Dis**; 1985 131:209-13.

Saldiva PH; Cardoso WV; Caldeira MP; Zin WA. Mechanics in rats by end-inflation occlusion and single-breath methods. **J Appl Physiol**; 1987 63:1711-8.

Saldiva PH; Zin WA; Santos RL; Eidelman DH; Milic-Emili J. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. **J Appl Physiol**; 1992 72:302-6.

Schuster DP. Quantifying lung injury in ARDS. In: Marini, J J; Evans, T W. Acute Lung Injury; 1998 181-96.

Selman M; Prado A. Potential role of proteases in pulmonary fibrosis. Annals of the **New York Academy of Sciences**; 2001 624: 297-306.

Silva MFR; Saldiva PHN. Paraquat poisoning: an experimental model of dosedependent acute lung injury due to surfactant dysfunction. **Braz J Med Biol Res**; 1998 31(3):445-50.

Similowski T; Bates JHT. Two-compartment modeling of respiratory system mechanics at low frequencies: gas redistribution or tissue rheology? **Eur Respir J**; 1991 4:353-8.

Similowski T; Levy P; Corbeil C; Albala M; Pariente R; Derenne JP; Bates JH; Jonson B; Milic-Emili J. Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption. **J Appl Physiol**; 1989 67:2219-29.

Slutsky AS; Scharf SM; Brown R; Ingram RH. The effect of oleic acid-induced pulmonary edema on pulmonary and chest wall mechanics in dogs. **Am Rev Respir Dis**; 1980 121:91-6.

Snapper JR; Hutchinson AA; Ogletree ML; Brigham KL. Effects of cyclooxygenase inhibitors on the alterations in lung mechanics caused by endotoxemia in the unanesthetized sheep. **J Clin Invest**; 1983 72: 63-76.

Snider GL; Celli BR; Goldstein RH; O'Brien JJ; Lucey EC. Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal blemycin: lung volumes, volume pression relations, carbon monoxide uptake, and arterial blood gas studies. **Am Rev Respir Dis**; 1978 117:289-97.

Snyder LS; Hertz MI; Harmon KR; Bitterman PB. Failure of lung repair following acute lung injury. Regulation of the fibroproliferative response (Part 1). **Chest**; 1990 98:733-8.

Souza AB; Santos FB; Negri EM; Zin WA; Rocco PRM. Remodelamento do tecido pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo. **J Pneumol**; 2003 29(4):235-45.

Souza-Fernandes AB; Pelosi P; Rocco PRM. Bech-to-bedside rewiew: The role of glycosaminoglycans in respiratory disease. **Crit Care**; 2006 10:237-252.

Stamme C; Bundschuh DS; Hartunh T; Gelbert U; Wollin L; Husing R; Wendel A; Uhlig S. Temporal sequence of pulmonary and systemic inflammatory responses to graded polymicrobial peritonitis in mice. **Infect Immun**; 1999 67:5642-50.

Starcher BC. Lung elastin and matrix. Chest; 2000 117:229S-34.

Suga M; Iyonaga K; Okamoto T; Gushima Y; Miyakawa H; Akaieke T; Ando M. Characteristic elevations of matrix metalloproteinase activity in idiopathic intersticial pneumonias. **Am J Respir Crit Care Med**; 2000 162:1946-56.

Suki B; Ito S; Stamenovic D; Lutchen KR; Ingenito EP. Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. **J Appl Physiol** 2005; 98:1892-1899.

Suntharalingam G; Regan K; Heogh BF; Morgan CJ; Evans TW. Influence of direct and indirect etiology on acute outcome and 6-month functional recovery in acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med**; 2001 29:562-6.

Swiderski RE; Dencoff JE; Floerchinger CS; Shapiro SD; Hunninghake GW. Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Am J Pathol**; 1998 152:821-8.

Sznajder JI. Strategies to increase alveolar epithelial fluid removal in the injured lung. **Am J Respir Crit Care Med**; 1999 160:1441-2.

Tantucci C; Cobeil C; Chassé M; Braidy J; Matar J; Milic-Emili J. Flow resistance in patient with chronic obstructive pulmonary disease in acute respiratory failure. **Am Rev Respir Dis**; 1992 145:355-60.

Tasaka S; Hasegawa N; Ishizaka A. Pharmacology of acute lung injury. **Pulm Pharmacol Ther**; 2002 15:83-95.

Tasaka S; Ishizaka A; Sayama K. Heat-killed *Cornebacterium parvum* enhances endotoxin lung injury with increased TNF production in guinea pigs. **Am J Respir Crit Care Med**; 1996 153:1047-55.

Taylor KR; Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: hostassociated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. **The FASEB Journal**; 2006 20: 9-22.

Terashima T; Kanazawa M; Sayama K. Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates acute lung injury induced by intratracheal endotoxin in guinea pigs. **Am J Respir Crit Care Med**; 1994 149:1295-303.

Terashima T; Marsubara H; Nakamura M. Local pseudomonas instillation induces contralateral lung injury and plasma cytokines. **Am J Respir Crit Care Med**; 1996 153:1600-5.

Tomashefski JFJr. Acute respiratory distress syndrome. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. **Clin Chest Med**; 2000 21:435-66.

Towes GB. Celluar alterations in fibroproliferative lung disease. **Chest**; 1999 116: 112-6.

Turino GM; Cantor JO. Hyaluronan in respiratory injury and repair. **Am J Respir Crit Care Med**; 2003 167: 1169-1175.

Uhal BD. Apoptosis in lung fibrosis and repair. Chest; 2002 122:293S-8S.

Verbrugge SJC; Lachmann B; Kesecioglu J. Lung protective ventilatory strategies in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: from experimental findings to clinical applications. **Clin Physiol Funct Imaging**; 2007 27:67-90.

Wallace WAH; Donelly SC. Pathogenesis of acute microvascular lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **Eur Respir Monograf**; 2002 7:22-32.

Ward PA; Hunninghake GW. Lung inflammation and fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**; 1998 157:123s-9s.

Ware LB. Prognostic determinants of acute respiratory distress syndrome in adults: Impact on clinical trial design. **Crit Care Med**; 2005 33:S217-S222.

Ware LB; Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**; 2000 342:1334-48.

Watson RWG; Redmond HP; Bouchier-Hayes D. Role of endotoxin in mononuclear phagocyte-mediated inflammatory responses. **J Leukoc Biol**; 1994 56:95-103.

Weibel ER. Morphometry: stereological theory and practical methods. In J Gil editor. **Models of Lung Disease - Microscopy and Structural Methods**; 1990 Vol. 47. Marcel Dekker. New York. 199-247.

Wheeler AP; Nernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. **Lancet**; 2007 369:1553-1565.

Wheeler AP; Jesmok G; Brigham KL. Tumor necrosis factor's effects on lung mechanics, gas exchange, and airway reactivity in sheep. **J Appl Physiol**; 1990 68:2542-9.

Wiener-Kronish JP; Albertine KH; Matthay MA. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. **J Clin Invest**; 1991 88:864-75.

Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor- β 1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. **Am J Pathol**; 2005 166(5):1321-32.

Winer-Muran HT; Steiner RM; Gurney JW. Ventilator-associated pneumonia in patients with adult respiratory syndrome: CT evaluation. **Radiology**; 1998 208:193-9.

Winkler MK; Fowlkes JL. Metalloproteinase and growth factor interactions: do they play a role in pulmonary fibrosis? **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**; 2002 283:L1-1.

Wright PE; Bernard GR. The role of airflow resistance in patients with the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**; 1989 139:1169-74.

Xisto DG; Farias LL; Ferreira HC; Picanco MR; Amitrano D; Lapa E Silva JR; Negri EM; Mauad T; Carnielli D; Silva LF; Capelozzi VL; Faffe DS; Zin WA; Rocco PR. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. **Am J Respir Crit Care Med** 2005 171(8):829-37.

Yamada H; Miyazaki H; Kikuchi T; Fujimoto J; Kudoh I. Acid instillation enhances the inflammatory response to subsequent lipopolysaccharide challenge in rats. **Am J Respir Crit Care Med**; 2000 162:1366-71.

Zimmerman JE; Kramer AA; Mcnair DS; Malila FM. Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) IV: hospital mortality assessment for today's critically ill patients. **Crit Care Med**; 2006 34: 1297-1310.

Zin WA; Martins MA; Silva PR; Sakae RS; Carvalho AL; Saldiva PH. Effects of abdominal opening on respiratory system mechanics in ventilated rats. **J Appl Physiol**; 1989 66:2496-501.

APÊNDICE

Livros Grátis

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

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 Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo